



POLSKIE TOWARZYSTWO
TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI

ŻYWNOŚĆ

NAUKA • TECHNOLOGIA • JAKOŚĆ

Suplement

Nr 3(24)

Kraków 2000

Rok 7

ŻYWNOŚĆ

Organ naukowy PTTŻ – kwartalnik

Nr 3(24) Supl.

Kraków 2000

Rok 7

SPIS TREŚCI

Od Redakcji.....	3
KRZYSZTOF KOŁODZIEJCZYK: Cechy użytkowe i kryteria doboru detektorów wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC stosowanych do badań składników żywności	5
AGNIESZKA ORKUSZ: Przegląd metod chromatograficznych stosowanych w analizie aminokwasów	14
JOANNA SOBOLEWSKA, JACEK ROŻNOWSKI, TERESA FORTUNA: Oznaczanie zawartości witamin A i E metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w wybranych produktach spożywczych ...	22
ELIŻA GRUCZYŃSKA, KATARZYNA MACIASZEK: Przeestryfikowanie jako metoda modyfikacji właściwości lipidów	31
JOANNA MILALA, BOGUSŁAW KRÓL: Zastosowanie TLC i HPLC w analizie jakościowej saponin	39
MAŁGORZATA PIECYK: Filtracja żelowa białek amorficznych i krystalicznych z nasion fasoli przy użyciu HPLC	48
ELWIRA WOROBIJ: Zmiany wielkości mas cząsteczkowych białek preparatów z nasion roślin strączkowych pod wpływem rodników hydroksylowych	55
RAFAŁ WOŁOSIAK: Zmiany aktywności przeciwutleniającej albumin grochu i fasoli pod wpływem kwasu askorbinowego	62
DOROTA SOSNOWSKA: Zmiany aktywności antyoksydacyjnej (+) katechiny w wyniku utleniania enzymatycznego	69
URSZULA MICHALSKA, HENRYK JELEŃ, ERWIN WAŚOWICZ: Charakterystyka związków lotnych wyizolowanych z zakwasu z mąki żytniej	77
MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, WIESŁAW KOPEĆ: Izolacja cystatyny z białka jaja z zastosowaniem filtracji membranowej i chromatografii powinowactwa	88
AGNIESZKA GŁOWACKA, TADEUSZ ANTCZAK, KATARZYNA KOŁUCKA, TADEUSZ TRZMIEL: Enzymatyczna synteza estru etylowego n-acetylo-l-tyrozyny w organicznych mediach	96
SYLWIA BONIN, WIESŁAW WZOREK: Długotrwała, ciągła fermentacja winiarska z drożdżami immobilizowanymi na szkle piankowym	105
KATARZYNA SZAMBELAN: Wykorzystanie bulw topinamburu (<i>Helianthus tuberosus</i> L.) do produkcji etanolu z użyciem drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	114
ANNA WLAŻŁY, ZDZISŁAW TARGOŃSKI: Polifenolooksydaza i β -glukozydaza w wybranych owocach jagodowych	122
EWA MAJEWSKA: Spektrofotometryczne oznaczanie aspartamu w wybranych produktach spożywczych typu „light”	133
MAGDALENA KOMISARUK-KASTELLI: Charakterystyka histochemiczna form handlowych ziarniaków ryżu dostępnych na polskim rynku	138
EWA MRÓWKA: V Sesja Młodej Kadry Naukowej PTTŻ – Postęp w technikach chromatograficznych w zastosowaniu do badań żywności	142
Adresy Zarządu Głównego, Oddziałów i Sekcji PTTŻ	145
Informacja dla autorów	146

Zamieszczone artykuły są recenzowane

Czasopismo jest referowane przez: AGRO-LIBREX, Chemical Abstracts Service i IFIS



**POLSKIE TOWARZYSTWO
TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI**

ŻYWNOŚĆ

NAUKA • TECHNOLOGIA • JAKOŚĆ

Suplement

Nr 3(24)

Kraków 2000

Rok 7

REDAKCJA:

Redaktor naczelny: prof. dr hab. Tadeusz Sikora; tel./fax 012/ 293-50-54

Sekretarz redakcji: dr Ewa Ślawska; tel. 012/ 411-91-44 w. 476; e-mail: rрпиasek@cyf-kr.edu.pl

Redaktorzy: prof. dr hab. Bohdan Achremowicz, dr inż. Anna Bala-Piasek, prof. dr hab. Mieczysław Pałasiński, dr Teresa Woźniakiewicz

Stali współpracownicy: prof. dr hab. Jacek Kijowski (Poznań), dr hab. Danuta Kołożyn-Krajewska (Warszawa), dr Grażyna Morkis (Warszawa), dr inż. Jerzy Pałasiński (Kraków), dr inż. Stanisław Popek (Kraków), doc. dr hab. Maria Soral-Śmietana (Olsztyn)

RADA PROGRAMOWA:

prof. dr Antoni Rutkowski (*przewodniczący*), dr hab. Kazimierz Dąbrowski (*sekretarz*), prof. dr hab. Zbigniew Duda, prof. dr hab. Józef Fornal, prof. dr hab. Roman Grzybowski, prof. dr hab. Mieczysław Jankiewicz, prof. dr hab. Jan Kisza, prof. dr hab. Andrzej Lenart, prof. dr hab. Helena Oberman, prof. dr hab. Zdzisław E. Sikorski, prof. dr hab. Tadeusz Tuszyński, prof. dr hab. Stanisław Tyszkiewicz

WYDAWCA:

POLSKIE TOWARZYSTWO TECHNOLOGÓW ŻYWNOŚCI
WYDAWNICTWO NAUKOWE PTTŻ

W latach 1994-1999 wydawcą kwartalnika był Oddział Małopolski PTTŻ

© Copyright by Polskie Towarzystwo Technologów Żywności, Kraków 2000

Printed in Poland

Wydawanie publikacji dofinansowane przez Komitet Badań Naukowych

ISSN 1425-6959

ADRES REDAKCJI:

31-425 KRAKÓW, AL. 29 LISTOPADA 46

SKŁAD I DRUK:



Wydawnictwo Naukowe „Akapit”, Kraków
tel./fax (012) 266-92-69

OD REDAKCJI

Szanowni Państwo,

przekazujemy Państwu Suplement nr 3(24) kwartalnika „Żywność”, w którym opublikowaliśmy artykuły będące pokłosem V Sesji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ nt.: „Postęp w technikach chromatograficznych w zastosowaniu do badań żywności”, która odbyła się w Rygni n/Zalewem Zegrzyńskim w dniach 29–30.05.2000 r.

Wyrażamy nadzieję, że zamieszczone w tym Suplemencie artykuły zostaną przyjęte z zainteresowaniem, nie tylko przez członków Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, ale także przez wszystkich naszych Czytelników.

Kraków, wrzesień 2000 r.

Redaktor Naczelny



Prof. dr hab. Tadeusz Sikora

KRZYSZTOF KOŁODZIEJCZYK

CECHY UŻYTKOWE I KRYTERIA DOBORU DETEKTORÓW WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ HPLC STOSOWANYCH DO BADAŃ SKŁADNIKÓW ŻYWNOSCI

Streszczenie

W artykule przedstawiono przegląd detektorów HPLC, używanych w analizach składników żywności, przeznaczony dla początkujących analityków. Omówiono zasady działania i podstawowe właściwości detektorów spektrofotometrycznych UV-Vis, refraktometrycznych (RI), elektrochemicznych, fluorescencyjnych i masowych wraz z kryteriami ich doboru do konkretnych analiz. Podano przykłady analiz HPLC składników żywności.

Wysokosprawną chromatografią cieczową HPLC jest obecnie popularną techniką analizy instrumentalnej i znajduje bardzo wiele zastosowań do analizy różnorodnych substancji. W procesie analizy chromatograficznej niezmiernie ważny jest dobór odpowiedniej metody, na co obok zastosowania odpowiedniej kolumny i właściwej fazy ruchomej składa się wybór odpowiedniego detektora. Nie jest to zadanie łatwe, w szczególności dla niedoświadczonego analityka. Artykuł ten skierowany jest przede wszystkim do rozpoczynających prace z aparaturą HPLC, a jego celem jest przybliżenie właściwości współcześnie stosowanych detektorów, a przez to ułatwienie właściwego doboru tej istotnej części aparatu HPLC.

Aparat do wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC to zespół urządzeń składający się z pompy lub układu pomp i mieszalników gradientowych, z zaworu nastrzykowego często zwanego inżektorem, kolumny, detektora i urządzenia rejestrującego, czyli rejestratora, integratora lub obecnie najczęściej używanego komputera wraz z odpowiednim oprogramowaniem [1, 3]. Detektor jest urządzeniem pozwalającym zarejestrować i zidentyfikować substancje rozdzielane na kolumnie chromatograficznej. Wyodrębniony składnik próbki niesiony przez fazę ruchomą trafia do detektora

i jego komórki pomiarowej, gdzie ulega oddziaływaniom fizykochemicznym, które są w odpowiedni sposób rejestrowane. Oddziaływania te to najczęściej procesy optyczne (załamanie światła, absorpcja, fluorescencja) [1, 2, 3]. Wykorzystuje się też reakcje elektrochemiczne czy spektroskopię masową [1, 7].

Idealny detektor powinien charakteryzować się zarówno dużą czułością, pozwalającą na rejestrowanie niewielkich ilości substancji, jak również wysoką selektywnością. Powinien również charakteryzować się stabilnością pozbawionej szumu linii zerowej oraz nie wykazywać czułości na zmiany fazy ruchomej. Detektory stosowane w praktyce nigdy nie wykazują cech detektora idealnego, dlatego ważna jest znajomość cech poszczególnych typów detektorów i dobór odpowiedniego do danego rodzaju oznaczenia [1, 3].

Detektory można podzielić na dwie podstawowe grupy: 1) ogólne – rejestrujące każdą zmianę we właściwościach fizycznych fazy ruchomej, inaczej mówiąc dokonujące pomiaru różnicowego właściwości wspólnej dla próbki i fazy ruchomej, np. współczynnik załamania światła, konduktywność; 2) specyficzne – rejestrujące charakterystyczne właściwości analizowanej substancji, takie jak fluorescencja czy aktywność elektrochemiczna, przy czym rejestrowany sygnał jest mało zależny lub niezależny od fazy ruchomej [1, 2, 3]. Jedynym stosowanym w praktyce przykładem detektora pierwszego rodzaju jest detektor refraktometryczny [2], natomiast drugi typ to detektory absorpcyjne, spektrofotometryczne, fluorescencyjne, elektrochemiczne czy oparte na spektroskopii masowej [1, 3]. Podstawowe właściwości detektorów zestawiono w tab. 1.

Tabela 1

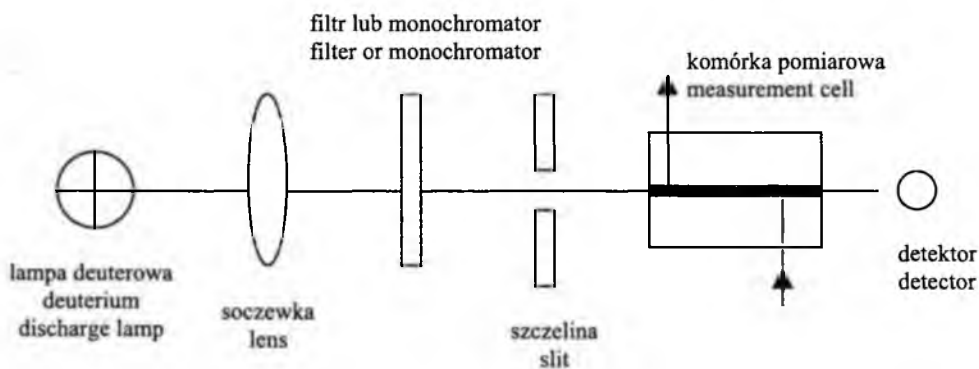
Właściwości detektorów HPLC.

Properties of HPLC detectors.

Typ detektora Detector type	Czułość Sensitivity	Selektywność Selectivity	Zakres zastosowań Range of application	Zastawianie w układach gradientowych Application at concentration gradient system	Koszt Costs
UV-Vis	dobra	dobra	bardzo szeroki	tak	niski
UV-Vis DAD	dobra	bardzo dobra	bardzo szeroki	tak	wysoki
Fluorescencyjny	bardzo dobra	bardzo dobra	wąski	tak	wysoki
refraktometryczny	bardzo słaba,	słaba	szeroki	nie	średni
Elektrochemiczny	bardzo dobra	bardzo dobra	rosnący	raczej nie	wysoki
Spektroskop masowy	słaba	bardzo dobra	wąski	możliwe	bardzo wysoki

Dobór detektora warunkowany jest rozdziałem próbki na kolumnie chromatograficznej [2]. Jeżeli następuje pełny rozdział możliwe jest użycie zarówno detektora uniwersalnego, reagującego na wszystkie składniki mieszaniny, jak i detektora specyficznego, rejestrującego tylko wybrany składnik. Jeżeli rozdział nie jest pełny, wówczas ze względu na nakładanie się pików w detektorze uniwersalnym należy stosować detektor specyficzny dla danego składnika. Kryteria doboru detektora związane są ściśle z postawionym celem analizy, tzn. oznaczenie wszystkich, kilku lub tylko jednego najważniejszego składnika. Istotne znaczenie ma skład badanej próbki, tj. liczba składników i ich właściwości fizyczne i chemiczne oraz skuteczność rozdziału w danym układzie chromatograficznym. To znów wiąże się z typem stosowanej kolumny, składem fazy ruchomej oraz sposobem elucji (izokratyczny lub gradientowy) [1, 2].

Detektorem o szerokim zastosowaniu jest detektor absorpcyjny UV-Vis [1, 2, 4]. Prostota jego konstrukcji, stosunkowo niewielki koszt i duża liczba aplikacji czyni go najbardziej popularnym wśród detektorów HPLC. Detektor taki jest zwykle częścią podstawowego wyposażenia zestawu HPLC [1, 2]; jest on również szeroko stosowany w badaniach składników żywności. [2] Należy jednak pamiętać, że analizowany składnik musi charakteryzować się absorpcją światła o długości fali z zakresu UV-Vis, a więc nie jest możliwe zastosowanie tego detektora np. do oznaczania alkoholi, w tym polioli oraz aldoz (np. glukozy, maltozy), natomiast niekiedy może być używany do oznaczania ketoz (np. fruktozy).



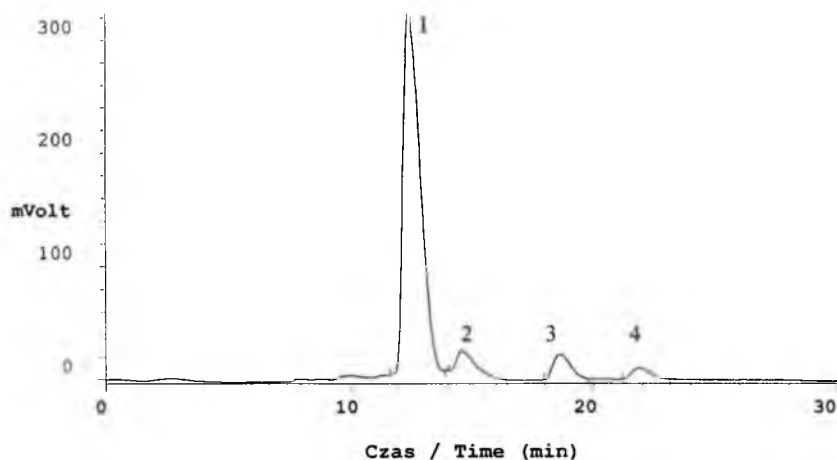
Rys. 1. Schemat detektora UV (jednopromieniowy).

Fig. 1. Diagram of UV detector (single-beam).

W układzie optycznym najprostszego detektora absorpcyjnego, światło o określonej długości fali ze źródła jest skupiane na komórce pomiarowej, przez którą przepływa faza ruchoma (rys. 1) [1, 2, 3]. Natężenie światła po przejściu przez komórkę jest mierzone przez fotodetektor. Za źródłem światła znajduje się urządzenie regulacji dłu-

gości fali. Ulepszeniem takiego detektora jest układ dwupromieniowy, w którym promień światła jest rozszczepiany na dwa, przy czym jeden przechodzi przez komórkę pomiarową, drugi poprzez zwierciadło i komórkę odniesienia kierowany jest na fotodetektor odniesienia [4]. Układ odniesienia służy do wyeliminowania zakłóceń powodowanych przez tzw. dryf i szumy. Układy elektroniczne detektora wzmacniają słabe sygnały do poziomu odpowiedniego dla integratora lub rejestratora, jednocześnie eliminując krótkotrwałe szumy [4].

Większość obecnie używanych detektorów UV-Vis to detektory o zmiennej długości fali. Wybór długości fali zależy od maksimum absorpcji oznaczanego składnika, jak również od stosowanej fazy ruchomej. Przykład zastosowania detektora UV przedstawiono na rys. 2.



Rys. 2. Rozdział kwasów karboksylowych za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej, detektor UV 210 nm. Kwasy: 1 – pirogronowy, 2 – bursztynowy, 3 – octowy, 4 – propionowy. Stężenia kwasów: po 5 g/dm³. Kolumna Aminex HPX 87 H, faza ruchoma: 0,004 M H₂SO₄, temp. 50°C, przepływ 0,5 ml/min.

Fig. 2. Separation of carboxylic acids by high performance liquid chromatography, UV detector 210 nm. Acids: 1 – pyruvic, 2 – succinic, 3 – acetic, 4 – propionic. Concentration of each acid: 5 g/dm³. Aminex HPX 87 H column, mobile phase: 0.004 M H₂SO₄, temp. 50°C, flow rate 0.5 ml/min.

Stosunkowo nowym osiągnięciem w dziedzinie detektorów UV-Vis są detektory spektrofotometryczne pozwalające rejestrować widma absorpcyjne substancji rozdzielanych na kolumnie [1, 2]. Ma to szczególne znaczenie w przypadku analizowania substancji o nieznanym składzie, gdzie nie wiadomo jakie maksimum absorpcji wykazują oznaczane składniki. Najważniejszym elementem takiego detektora jest linijka diodowa (ang. diode array), stąd też detektory te zwane są detektorami DAD. W oma-

wianym detektorze światło ze źródła Z jest rozszczepiane na dwa promienie, z których jeden po skupieniu przechodzi przez komórkę pomiarową, drugi przez komórkę odniesienia. Następnie po rozszczepieniu na siatce dyfrakcyjnej promienie kierowane są na linijki diodowe, odpowiednio pomiarową i odniesienia. Ponieważ rejestrowane jest dyskretne (nieciągłe) widmo absorpcyjne, możliwe jest otrzymywanie chromatogramów trójwymiarowych. W związku z tym możliwe jest badanie czystości rozdzielanych substancji, a także analiza ilościowa dwóch substancji o tym samym czasie retencji. Detektory DAD znajdują coraz więcej zastosowań, ciągle powstają nowe metody analizy z ich wykorzystaniem, jednakże koszt takiego detektora jest ciągle zbyt wysoki. Ponadto rejestracja danych wymaga bardziej skomplikowanego oprogramowania.

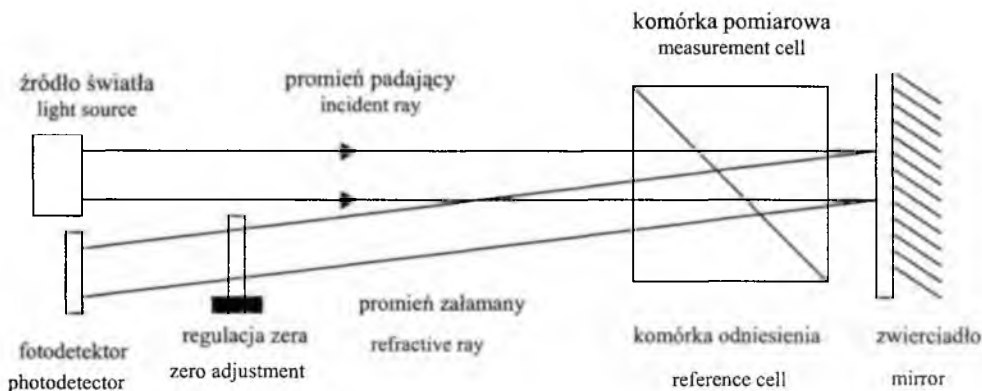
Ciekawą alternatywą proponowaną przez producentów sprzętu są detektory posiadające cechy użytkowe detektorów UV-Vis o zmiennej długości fali, jednakże o budowie opartej na technologii DAD, tzn. zamiast fotodetektora i urządzenia do regulacji długości fali wyposażone są w linijkę diodową. Urządzenia takie zwykle charakteryzują się parametrami lepszymi niż klasyczne detektory spektrofotometryczne, a ponadto dają możliwość rozbudowy do detektora diodowego wykazującego wszystkie cechy typowego urządzenia DAD, czyli możliwość rejestracji widma absorpcyjnego [7].

Innym typem detektora jest detektor fluorescencyjny [1, 2, 3]. Jego zasada działania oparta jest na zjawisku oddawania przez cząsteczki wzbudzone energii w postaci światła o określonej długości fali (czyli fluorescencji). Komórka pomiarowa detektora fluorescencyjnego oświetlana jest światłem o określonej długości fali. Światło emitowane przez substancję przepływającą przez komórkę jest skupiane filtrowane w ten sposób, że określona długość fali (odpowiadająca emisji analizowanej substancji) trafia na fotodiody, skąd odbierany jest sygnał pomiarowy. W układzie optycznym znajduje się też fotodiody odniesienia, na którą kierowany jest sygnał bezpośrednio ze źródła światła. Pomimo, że czułość tego detektora jest znacznie większa niż czułość detektora absorpcyjnego UV-Vis, detektor fluorescencyjny stosunkowo rzadko używany jest w badaniach składników żywności. Za jego pomocą można oznaczać tylko substancje wykazujące właściwość fluorescencji lub ulegające derywatywacji do takich substancji. Ilość aplikacji dotyczących składników żywności jest niewielka.

Zasada działania detektora refraktometrycznego oparta jest na refrakcji opisanej równaniem Lorentza-Lorentza i prawem Sneliusa, które wiąże współczynnik refrakcji z kątem załamania [5]. W detektorze mierzy się natężenie oświetlenia fotokomórki przez promień załamany na komórce pomiarowej, co związane jest ze zmianami kąta załamania, które są proporcjonalne do współczynnika załamania ośrodka, a więc do stężenia substancji zawartej w fazie ruchomej (rys. 3) [1].

Promień ze źródła światła jest kierowany na element zbudowany z komórki pomiarowej i komórki odniesienia, następnie odbija się od zwierciadła, przechodzi przez

plytkę regulacji zera i trafia na fotodiode (fotodetektor) (rys. 3) [2]. Komórkę odniesienia wypełnia się czystą fazą ruchomą. Gdy przez komórkę pomiarową przepływa faza ruchoma, wykonuje się ustawienie zera, wówczas dioda naświetlana jest promieniem o maksymalnym natężeniu. Gdy w komórce pomiarowej wraz z eluentem pojawi się substancja, promień świetlny ulegnie załamaniu, w związku z tym na fotodiode trafi tylko część promienia. Różnica w natężeniu oświetlenia, a więc różnica napięcia na fotodiodzie jest wprost proporcjonalna do stężenia substancji w fazie ruchomej.



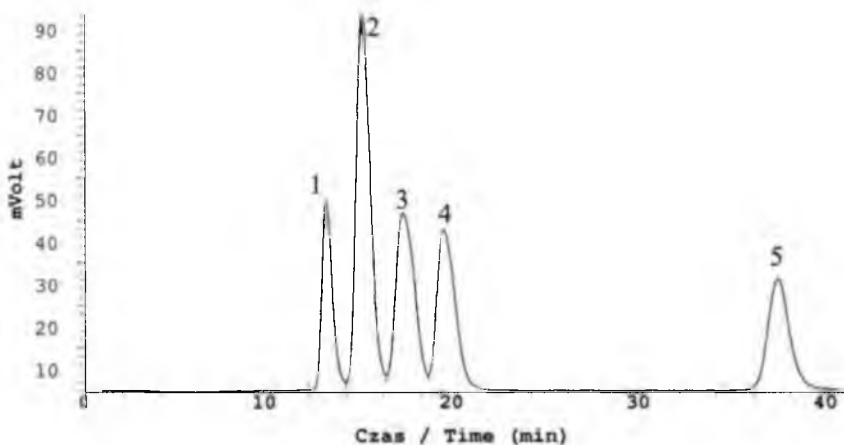
Rys. 3. Schemat detektora RI.

Fig. 3. Diagram of RI detector.

Detektor refraktometryczny (detektor RI – *ang.* refractive index) jest detektorem o charakterze uniwersalnym. Z tego względu charakteryzuje się małą czułością i wrażliwością na wiele czynników. Ta cecha decyduje, że jest to detektor nie nadający się do pracy w układach gradientowych. Jeśli stosuje się wieloskładnikowe fazy ruchome, należy raczej sporządzić mieszaninę i podawać ją za pomocą pompy izokratycznej niż korzystać z układu pomp i mieszalników. Na pracę detektora duży wpływ ma pulsacja pompy – wymagania stawiane pompie współpracującej z detektorem RI są pod tym względem o wiele wyższe niż w przypadku pracy z innymi detektorami. Jeśli w układzie stosuje się kilka połączonych szeregowo detektorów, detektor RI musi zawsze być ostatni w szeregu. [2] W przeciwnym razie opór powodowany przez następny detektor mógłby stwarzać zakłócenia w przepływie fazy ruchomej wpływającej z detektora RI, co oddziaływałoby na sygnał. Niemniej ważnym czynnikiem jest zachowanie stałej temperatury, dlatego też korzystne, a w niektórych przypadkach konieczne jest termostatowanie. Pomimo tych wszystkich niedogodności detektor RI jest bardzo często stosowany w badaniach żywności. Jest on niezbędny przy analizie cukrów, których nie da się oznaczać przy użyciu detektora UV. W związku z tym detektor RI powinien być częścią wyposażenia każdego laboratorium wykonującego rutynowe oznaczenia cu-

krów, alkoholi i kwasów organicznych. Przykład zastosowania detektora RI przedstawiono na rys. 4.

Zasada działania detektora elektrochemicznego opiera się na utlenianiu lub redukcji analizowanej substancji w komórce przepływowej przy udziale przyłożonego stałego potencjału [2, 6]. Kompensacje zmian powodowanych utlenieniem lub redukcją stanowią sygnał pomiarowy. Zakres zastosowania detektorów elektrochemicznych jest dość szeroki. Detektor elektrochemiczny może pracować w trzech trybach: stałego potencjału (DC mode) – detektor klasyczny, stosuje się do oznaczania substancji łatwo ulegających utlenianiu (np. fenol, aminy aromatyczne, tiole) lub redukcji (np. chinony, nitrozoaminy); tryb pulsacyjny (pulse mode) – zastosowanie do substancji nie dających się oznaczać w trybie DC, takich jak cukry, alkohole, niektóre aminy, aminokwasy i związki siarkowe; oraz tryb przemiatania (scan mode) – zmienny potencjał, inne, specjalne zastosowania. Ważnym czynnikiem jest też rodzaj elektrody stosowanej w komórce pomiarowej. Detektor elektrochemiczny charakteryzuje się dużą czułością w odniesieniu do substancji łatwo ulegających utlenianiu lub redukcji (np. pochodne fenolowe), co przy potencjalnie szerokim zakresie zastosowań czyni je bardzo cennym

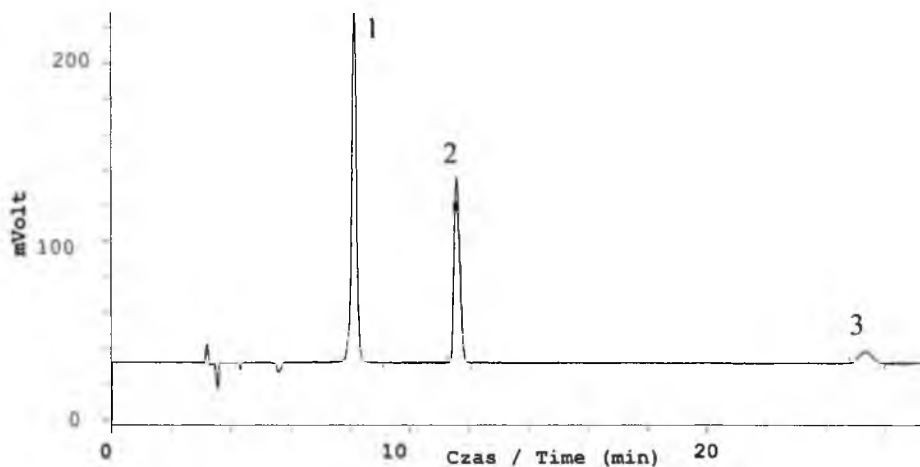


Rys. 4. Rozdział cukrów i polioliu za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Detektor RI. 1 – rafinoza $0,05 \text{ g/dm}^3$, 2 – laktoza $0,084 \text{ g/dm}^3$, 3 – glukoza $0,062 \text{ g/dm}^3$, 4 – galaktoza $0,064 \text{ g/dm}^3$, 5 – ksylitol $0,068 \text{ g/dm}^3$. Kolumna Aminex HPX 87 C, faza ruchoma: woda, temp. 85°C , przepływ $0,4 \text{ ml/min}$.

Fig. 4. Separation of sugars and polyol by high performance liquid chromatography. RI detector. 1 – raffinose 0.05 g/dm^3 , 2 – lactose 0.084 g/dm^3 , 3 – glucose 0.062 g/dm^3 , 4 – galactose 0.064 g/dm^3 , 5 – xylitol 0.064 g/dm^3 . Aminex HPX 87 C column, mobile phase: water, temp. 85°C , flow rate 0.4 ml/min .

narzędziem analizy. Detektory elektrochemiczne są dość podatne na zakłócenia elektrochemiczne (zanieczyszczenia fazy ruchomej), elektryczne (pochodzące od układów elektronicznych: złe połączenia, złe uziemienie itp.) czy mechaniczne (pulsacja pompy). W związku z tym konieczny jest odpowiedni dobór urządzeń współpracujących. Ponadto detektory elektrochemiczne i ich wymienne komórki pomiarowe charakteryzują się wysoką ceną.

Sprzężenie chromatografii ciekowej ze spektroskopią masową, podobnie jak w przypadku GC-MS jest bardzo interesującym rozwiązaniem analitycznym [7]. Detektory MS mają potencjalnie szeroki zakres zastosowań w analizach HPLC, również do analizy składników żywności. Dysponując odpowiednią biblioteką widm masowych analityk posiada bardzo duże możliwości identyfikacji. Pomimo to zastosowania są ograniczone ze względu na wysoki koszt samego detektora. Jest to więc rozwiązanie dla ściśle wyspecjalizowanych, dysponujących dużym budżetem laboratoriów. Ponadto HPLC-MS jest techniką stosunkowo nową, tak więc biblioteki widm ciągle są tworzone i nie są jeszcze dostępne dla wszystkich grup możliwych do oznaczania substancji.



Rys. 5. Rozdział amin i aminokwasów za pomocą wysokosprawnej chromatografii ciekowej. Detektor elektrochemiczny pracujący w trybie stałonapięciowym. 1 – 3,4-dihydroksyfenyloamina $0,01 \text{ mM/dm}^3$, 2 – tyrozyna 2 mM/dm^3 , 3 – 3-nitrotyrozyna 2 mM/dm^3 . Kolumna RP 18, faza ruchoma: metanol, temp. 35°C , przepływ $0,5 \text{ ml/min}$.

Fig. 5. Separation of amines and amino acids by high performance liquid chromatography. Electrochemical DC-mode detector. 1 – 3,4-dihydroxyphenylamine 0.01 mM/dm^3 , 2 – tyrosine 2 mM/dm^3 , 3 – 3-nitrotyrosine 2 mM/dm^3 . RP 18 column, mobile phase: methanol, temp. 35°C , flow rate 0.5 ml/min .

Wśród innych detektorów HPLC, rzadziej lub nie stosowanych przy badaniach żywności, można wymienić detektory radioaktywności, detektory aktywności optycznej i detektory płomieniowo-jonizacyjne [1, 3].

Przedstawione powyżej cechy i związane z nimi kryteria doboru detektorów HPLC są interesującym tematem samym w sobie, ale należy podkreślić że stanowią one jedynie fragment metodologicznej problematyki analiz HPLC, uwzględniającej wszystkie elementy tej techniki badawczej.

LITERATURA

- [1] Lough W.J., Wainer I.W. (ed.): High performance liquid chromatography. Fundamental, principles and practice. Blackie Academic & Professional, Glasgow 1992.
- [2] Macrae R. (ed.): HPLC in food analysis. Academic Press, London 1988.
- [3] Hamilton R.J., Sewell P.A.: Wysokosprawną chromatografia cieczowa. PWN, Warszawa 1982.
- [4] Instrukcje detektora HPLC: Variable wavelength monitor No. A0293. Operating manual No. 0890 version V7026. Knauer.
- [5] Instrukcje detektora HPLC: Differential-Refractometer with auto-zero for analytical and semi-preparative use No. A0298. Knauer.
- [6] Instrukcje detektora HPLC: Decade digital electrochemical Amperometric detector. Antec Leyden.
- [7] Materiały reklamowe firmy Agilent Technologies.

FUNCTIONAL FEATURES AND CHOICE CRITERIA OF HPLC DETECTORS USED IN FOOD COMPONENTS ANALYSIS

S u m m a r y

Review of HPLC detectors used in food components analysis, meant for beginning analyst. The principles of operation and basic properties of spectrophotometric UV-Vis, refractive index (RI), electrochemical, fluorescence, and mass detectors with criteria of choice for particular analysis are discussed. The examples of HPLC analysis of food components are given. ☒

AGNIESZKA ORKUSZ

PRZEGLĄD METOD CHROMATOGRAFICZNYCH STOSOWANYCH W ANALIZIE AMINOKWASÓW

Streszczenie

Celem artykułu jest przegląd metod chromatograficznych stosowanych w analizie aminokwasów (chromatografia bibułowa i cienkowarstwowa, elektrochromatografia, chromatografia gazowa, cieczowa – kolumnowa, wysokosprawną chromatografią cieczową). Szczegółowo omówiona zostanie metoda z zastosowaniem HPLC chromatografu AminoQuant 1090 seria II z detektorem UV-Vis (DAD) firmy Hewlett Packard.

Duża ilość metod oznaczania i chromatograficznego rozdzielania aminokwasów spowodowana jest poszukiwaniem dobrej metody ich rozdzielania (chromatografia bibułowa i cienkowarstwowa, gazowa, cieczowa – kolumnowa, wysokosprawną chromatografią cieczową).

Chromatografia bibułowa i cienkowarstwowa

Aminokwasy były jedną z pierwszych klas związków, które udało się rozdzielić metodą chromatografii bibułowej, stosowaną początkowo do jakościowej identyfikacji poszczególnych aminokwasów, a następnie do ilościowego ich oznaczania. Jako pierwsi metodę chromatograficznego rozdzielania aminokwasów na bibule opracowali Condon M., Gordon A., Martin J. [18]. Po ukazaniu się pracy wyżej wymienionych autorów, wielu badaczy pracowało nad udoskonaleniem owej metody, m.in. Opieńska-Blauth, która ulepszyła bibułową chromatografię dwukierunkową opracowując zimny test ninhydrynowy – wywoływania aminokwasów w postaci barwnych plam, dzięki któremu udało się zidentyfikować 21 aminokwasów [17]. Metodę nadającą się do ilościowego oznaczania aminokwasów na bibule opracował Mc Farren [16, 18], który

rozdzielił mieszaninę aminokwasów na kilku chromatogramach jednokierunkowych, rozwijanych w różnych rozpuszczalnikach.

Metoda chromatografii bibułowej nie pozwalała na całkowite rozdzielenie mieszaniny wszystkich aminokwasów na jednym arkuszu bibuły, zanieczyszczenia bibuły powodowały powstawanie smug i zniekształcenia wywołanych plam aminokwasów. Wadą chromatografii bibułowej dwukierunkowej było stosunkowo duże zużycie bibuły i odczynników, długotrwałość postępowania oraz konieczność użycia dwóch niezależnych komór chromatograficznych.

Udoskonaleniem chromatografii bibułowej była chromatografia cienkowarstwowa (zamiast bibuły stosowano płytki pokryte warstwą sorbentu), dzięki której znacznie skrócono czas rozwijania chromatogramu, plamki były mniej rozmyte niż na bibule oraz można było wykrywać mniejsze ilości analizowanych substancji. Większa uniwersalność chromatografii cienkowarstwowej, w porównaniu z chromatografią bibułową, wynika również z możliwości stosowania różnych sorbentów, które są mniej niż bibuła wrażliwe na niszczące działanie rozpuszczalników stosowanych zarówno do rozwijania, jak i wywoływania chromatogramów [10].

Powszechnie używanymi układami rozpuszczalników do rozwijania chromatogramów w chromatografii bibułowej i cienkowarstwowej były: n-butanol, kwas octowy, woda (12:3:5); fenol, woda (3:1); n-butanol, aceton, amoniak, woda (10:10:5:2); izopropanol, kwas mrówkowy, woda (20:1:5). Najczęściej używanym odczynnikiem do wywoływania aminokwasów była ninhydryna w acetonie [21,10] lub w butanolu [7]. Stosowano również modyfikacje odczynnika ninhydrynowego, przez związanie go z metalami, m.in.: z miedzią [20], rtęcią [5].

Mimo niewątpliwych zalet chromatografia cienkowarstwowa miała również wady. Różnice w strukturze sorbenta na poszczególnych płytkach oraz w warunkach panujących w komorach chromatograficznych w czasie procesu rozwijania chromatogramu, uniemożliwiały otrzymanie stałych, powtarzalnych wyników [23].

Elektrochromatografia

Haugaard i Kroner, jako pierwsi opracowali metodę rozdziału aminokwasów z zastosowaniem pola elektrycznego. Połączyli oni chromatografię bibułową z równoczesną elektroforezą. Metoda ta polegała na przyłożeniu napięcia do arkusza bibuły nasyconego buforem fosforanowym o $\text{pH} = 6,2$ z równoczesnym rozdziałem chromatograficznym za pomocą fenolu jako fazy ruchomej. W ten sposób rozdzielili 10 aminokwasów [18]. Lepsze wyniki rozdziału mieszaniny aminokwasów otrzymano stosując elektrochromatografię wysokonapięciową, polegającą na stosowaniu wysokiego spadku potencjału (40 do 200 V/cm). Zaletą tej metody było zmniejszenie efektu dyfuzji i elektroosmozy, co pozytywnie wpłynęło na jakość rozdziału poszczególnych frakcji oraz krótki czas rozdziału. Główną wadą tej metody była konieczność odprowadzenia

dużej ilości energii cieplnej, jaka wytwarzała się w toku elektroforezy. Po raz pierwszy elektrochromatografię wysokonapięciową zastosowali Kickhöfen i Westphal, którzy rozdzielili aminokwasy najpierw elektroforetycznie (przy zastosowaniu spadku potencjału 70 V/cm w ciągu 200 min), a następnie – w kierunku prostopadłym do poprzedniego stosowali chromatografię rozdzielczą w układzie: pirydyna – kwas octowy – woda (50:75:15) w ciągu 17 godzin [11]. Metoda ta nie dawała całkowitego rozdziału wszystkich aminokwasów. Nad udoskonaleniem elektrochromatografii wysokonapięciowej pracował Masłowski, który przeprowadził dokładne badania dotyczące m.in.: doboru odpowiedniej komory elektroforetycznej, czasu rozwijania elektroforegramów oraz wysokości stosowanych napięć [14]. Skonstruował on komorę, w której odprowadzanie ciepła zachodziło przez bezpośrednie położenie zwilżonej buforem bibuły na ochłodzoną od zewnątrz płytę szklaną, a nie jak w komorze Michla [18, 24] zastosowanej w metodzie Kickhöfena i Westphala, za pomocą cieczy izolującej np. toluenu. Udało mu się również zmniejszyć do minimum elektroosmozę, przez zastosowanie folii celofanowej łączącej bibułę filtracyjną z buforem [14]. Masłowski wykazał, że stosowanie wysokich napięć: 120–150 V/cm skracало czas analizy, ale powodowało jednocześnie powstawanie dużych ilości ciepła. Zbyt niskie napięcia (poniżej 35 V/cm) nie dawały całkowitego rozdziału. Najodpowiedniejszym napięciem do rozdziału aminokwasów kwaśnych i zasadowych przy zastosowaniu buforu o pH 6,5, okazało się 50–60 V/cm, natomiast w przypadku aminokwasów obojętnych przy zastosowaniu buforu o pH = 2, 60–80 V/cm. Czas rozwijania elektroforegramów przy zastosowaniu powyższych napięć powinien wynosić 60 do 120 minut. Dłuższy czas na skutek dyfuzji powodował bowiem zwiększenie powierzchni plam, co wpływało negatywnie na rozdział aminokwasów leżących blisko siebie.

Metoda opracowana przez Masłowskiego pozwoliła na rozdzielenie mieszaniny 18 aminokwasów w postaci zwartych i symetrycznych plamek, co w ogromnej mierze ułatwiło oznaczenie ilościowe.

Chromatografia gazowa

Rozdział aminokwasów przeprowadzano również stosując metodą chromatografii gazowej, w której konieczne było przeprowadzenie aminokwasów w ich lotne pochodne, takie jak: N-acetylowe, trinitroacetylowe [3] trimetylosililowe [26] estry n-butyłowe N-trifluoroacetyloaminokwasów. Jako fazy stacjonarne stosowano glikobursztynian neopentylu lub też bursztynian polibutanodiolu [3]. Trudności w tej metodzie sprawiało przeprowadzanie aminokwasów w ich lotne pochodne.

Chromatografia kolumnowa jonowymienna

Z wielu metod chromatografii cieczowej powszechne uznanie zyskała chromatografia jonowymienna z użyciem żywicy polistyrenowo-sulfonowej Dowex 50. Chromatografia na jonitach pozwalała na jednorazowe rozdzielanie stosunkowo dużych ilości oznaczanych aminokwasów, a także charakteryzowała się małym błędem metodycznym. Metoda opracowana przez Moorea i Steina, zaliczana do metod klasycznych, polegała na przepuszczaniu przez jonit mieszaniny aminokwasów i eluowaniu ich buforami cytrynianowymi o wzrastającym pH [18, 21]. Frakcje zbierano za pomocą kolektora frakcji, będącego jednym z pierwszych automatycznie działających aparatów do zbierania frakcji wycieku [18], w uzyskanych frakcjach aminokwasy oznaczano ilościowo odczynnikiem ninhydrynowym. Z biegiem lat kolektor frakcji zastąpiono detektorami przepływowymi, które w sposób ciągły rejestrują strumień eluentu, automatycznie wskazują kiedy analizowane związki opuszczają kolumnę chromatograficzną [12]. Dalsze usprawnienia w końcowym efekcie doprowadziły do konstrukcji automatycznych analizatorów aminokwasów.

Do rozdzielania aminokwasów stosowano również kolumny wypełnione jonitami skompleksowanymi z kationami cynku lub miedzi [13].

Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Dużym osiągnięciem w analizie aminokwasów jest wysokosprawna kolumnowa chromatografia cieczowa, będąca metodą w pełni zautomatyzowaną, sterowaną komputerowo, z systemem przetwarzania danych. Powstała ona w oparciu o tradycyjną chromatografię kolumnową, dzięki m.in.: zmniejszeniu długości kolumn oraz ich średnicy wewnętrznej i ulepszeniu systemów detekcji. Stosowane w klasycznej kolumnowej chromatografii cieczowej kolumny do oznaczania aminokwasów miały różnorodną długość 100 cm [8], 150 cm [9], i średnicę, np. 5,5 mm [18]. Obecnie do oznaczania aminokwasów stosowane są kolumny o dł. 20 cm [22] – 25 cm [4], i średnicy 2,1 mm [22] i 4,6 mm [1]. Konsekwencją redukcji długości kolumny i jej średnicy jest m.in. zmniejszenie zużycia kosztownych rozpuszczalników stosowanych w HPLC, skrócenie czasu analizy, lepsza odtwarzalność wyników [19, 25]. Najczęściej stosowanymi obecnie detektorami do oznaczania aminokwasów są: detektory UV-Vis [2, 22] i detektory fluorescencyjne [1, 6, 15].

Przykładem urządzenia do przeprowadzania oznaczeń aminokwasów metodą HPLC jest w pełni zautomatyzowany AminoQuant 1090 firmy Hewlett Packard (czynności manualne sprowadzają się tylko do przygotowania próbki i wzorca oraz do uruchomienia komputera), którego podstawowe elementy stanowią: automatyczny dozownik, prekolumna (20x2,1 mm), właściwa kolumna chromatograficzna (200x2,1

mm), detektor UV-Vis (Diode-Array Detector) lub fluorescencyjny oraz komputer z odpowiednim oprogramowaniem.

Automatyczny dozownik umożliwia wprowadzenie badanej próbki oraz fazy ruchomej na kolumnę chromatograficzną. Przy dozowniku znajduje się stojak, w którym kolejne pięć miejsc zajmują: odczynniki służące do przeprowadzania aminokwasów w pochodne (orto-ftalaldehyd-OPA i 9-fluoroenylometylochloroform-FMOC), bufor boranowy i trzy wzorce zawierające mieszaniny tych samych aminokwasów, ale o różnych stężeniach; kolejne miejsca (do 99) zajmują próby badane.

W prekolumnie (20x2,1 mm), której wypełnienie stanowi ODS Hypersil (C₁₈) o wielkości ziaren 5 µm następuje przeprowadzanie aminokwasów w pochodne orto-ftalaldehydowe i 9-fluoroenylometylochloroformowe.

We właściwej kolumnie chromatograficznej (200x2,1 mm), której niepolarne, stałe wypełnienie stanowi Vydac (C₁₈) o wielkości ziaren 5 µm następuje wymywanie aminokwasów za pomocą układu dwóch rozpuszczalników (chromatografia gradientowa), które stanowią polarną fazę ruchomą. W skład pierwszego rozpuszczalnika wchodzi: octan sodu, trietyloamina i tetrahydrofuran; skład drugiego to: octan sodu, acetonitryl i metanol. W elucji gradientowej wymywanie aminokwasów zaczyna się eluentem o małej sile elucji, a następnie dodaje eluent o dużej sile. Sumaryczna objętość eluentu przepływającego przez kolumnę w jednostce czasu jest stała, natomiast różne są objętości poszczególnych eluentów (początek analizy 100% rozpuszczalnika A, 0% rozpuszczalnika B, w 18 min 0% rozpuszczalnika A i 100% rozpuszczalnika B).

Jako, że wypełnienie kolumny jest niepolarne, a faza ruchoma jest polarna, mamy do czynienia z odwróconym układem faz, który jest obecnie stosowany znacznie częściej niż normalny układ faz. Jest to spowodowane tym, że polarne adsorbenty używane w normalnym układzie faz silnie adsorbują wodę obecną w rozpuszczalnikach nawet w ilościach śladowych, w wyniku czego aktywność adsorbentu maleje, a kolumna traci swoje początkowe właściwości rozdzielcze. Zjawisko to nie występuje na niepolarnych wypełnieniach kolumny chromatograficznej [8]. Czas rozdziału wynosi 18 minut.

W skład AminoQuantu 1090 wchodzi detektor UV-Vis (Diode Array Detector), który może być używany do detekcji przy ośmiu różnych długościach fal jednocześnie (w zakresie długości fal od 190 nm do 950 nm), ale tylko dwie długości fali są używane do oznaczania aminokwasów, tj. 262 nm dla aminokwasów – pochodnych FMOC oraz 338 nm dla aminokwasów będących pochodnymi OPA. Detektor diodowy może być zastąpiony przez detektor fluorescencyjny, który jest detektorem bardziej czułym od opisanego powyżej.

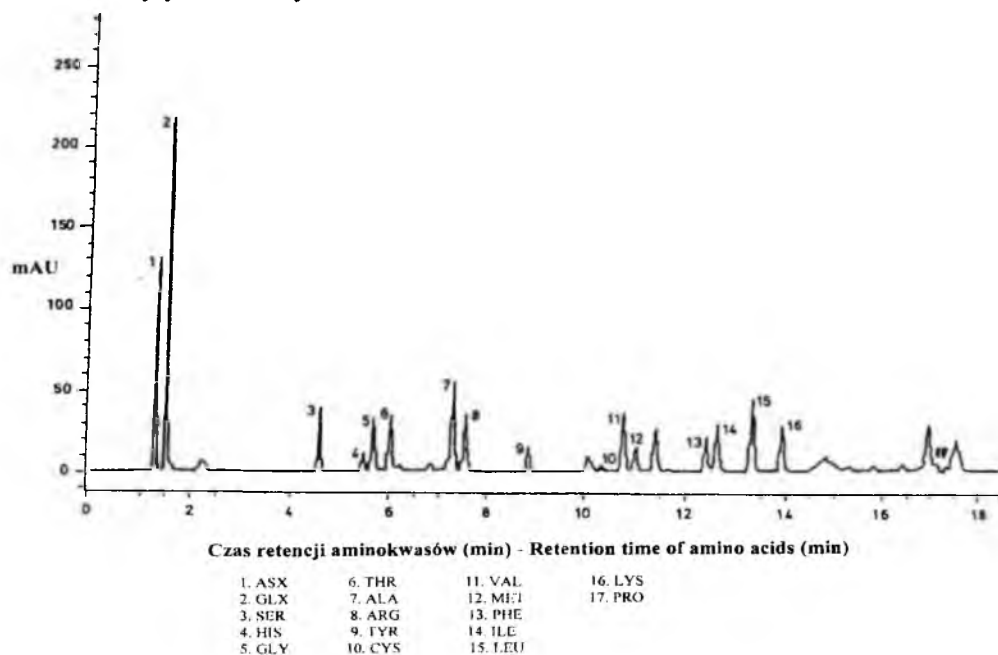
Cały proces analizy aminokwasów kontrolowany jest za pomocą zintegrowanego układu, w skład którego wchodzi: komputer, monitor i klawiatura. Wszystkie operacje: ich ilość, czas, kolejność, są zaprogramowane przed przystąpieniem do analizy (np.:

przeprowadzanie aminokwasów w pochodne, kolejność dodawania odczynników do badanej próbki, szybkość i czas trwania mieszania tych odczynników z badaną próbką).

Komputer rejestruje sygnały wychodzące z detektora, charakteryzujące poszczególne piki (rejestruje czas retencji, powierzchnię pików); oblicza ilościowy skład próbki oraz identyfikuje poszczególne składniki analizowanej mieszaniny na podstawie chromatogramów aminokwasów wzorcowych wprowadzonych do pamięci komputera.

Łączny czas analizy – od momentu pobrania próbki przez dozownik do wydruku wyników – wynosi 35 min.

Wydruk wyników otrzymuje się w postaci chromatogramu (przykładowy chromatogram ilustruje rys. 1) oraz tabeli. Chromatogram przedstawia rozdział mieszaniny aminokwasów. Na osi x znajduje się czas retencji, na osi y wskazanie detektora. Aminokwasy wymywane są z kolumny chromatograficznej w kolejności, jak pokazano na rys. 1. W oparciu o czas retencji dokonuje się identyfikacji poszczególnych aminokwasów. Tabela zawiera kolejno: nr aminokwasu, czas retencji, długość fali świetlnej, przy której jest oznaczany, nazwę aminokwasu, powierzchnię piku, zawartość aminokwasu (ng/μl wprowadzonej próbki), stężenie aminokwasu (pmol/μl wprowadzonej próbki), które w zależności od sposobu prezentacji wyników, można przeliczać na: azot, białko, surowiec użyty do analizy.



Rys. 1. Rozdział aminokwasów z mięsnego hydrolizatu.

Fig. 1. The chromatogram of amino acids from meat hydrolyzate.

LITERATURA

- [1] Ashworth R.B.: Amino acid analysis for meat protein evaluation. *J. Assoc. of Anal. Chem.*, **1**, 1987, 80.
- [2] Aristoy M.C., Toldra F.: Deproteinization techniques for HPLC amino acid analysis in fresh pork muscle and dry-cured ham. *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1991, 1792.
- [3] Berthillier A.: *Chromatografia i jej zastosowania*. PWN, Warszawa 1975.
- [4] Biesaga M., Orska J., Trojanowicz M.: HPLC of amino acids using tetraphenylporphyrin-silica stationary phases. *Chem. Anal.*, **43** (4), 1998, 647.
- [5] Borkowski T., Madecka-Borkowska I.: Oznaczanie aminokwasów metodą chromatografii bibułowej. *Chem. Anal.*, **1-2**, 1959, 119.
- [6] Chuaqui-Offermans N., McDougall T.: An HPLC method to determine o-tyrosine in chicken meat. *J. Agric. Food Chem.*, **39** (2), 1991, 300.
- [7] Gowu T.H. (red.): *Nowoczesne metody instrumentalne analizy*. WNT, Warszawa 1976.
- [8] Hamilton R.J., Sewell P.A.: *Wysokosprawna chromatografia cieczowa*. PWN, Warszawa 1982.
- [9] Hirs C.H., Moore S., Stein W.: The chromatography of Amino Acids on ion exchange resins. Use of volatile acids for elution. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1954, 6063.
- [10] Jarosz M., Malinowska E.: *Pracownia chemiczna. Analiza instrumentalna*. WSiP, Warszawa 1999.
- [11] Kickhöfen B., Westphal O.: *Z. Naturforsch.*, **7b**, 1952, 659.
- [12] Kirkland J. (red.): *Współczesna chromatografia cieczowa*. PWN, Warszawa 1976.
- [13] Masłowska J., Gasińska E.: Nowe metody rozdzielania mieszaniny aminokwasów na kolumnach jonitowych obsadzonych kationami cynku lub miedzi. *Chem. Anal.*, **29** (2), 1984, 163.
- [14] Masłowski P.: Wysokonapięciowa elektrochromatografia bibułowa aminokwasów w różnych okresach kiełkowania *Hordeum sativum*. *Roczn. Nauk Roln.*, **81**, 1960, 561.
- [15] Meier W., Buerger R., Froehlich D.: Analysis of o-tyrosine as a method for the identification of irradiated chicken meat. *Beta Gamma*, **1**, 1988, 34.
- [16] Muszkatowa B.: Badania nad składem aminokwasowym i uzupełnianiem się białek produktów spożywczych z zastosowaniem ilościowej chromatografii bibułowej. *Roczniki PZH*, **XIV** (3), 1963, 249.
- [17] Opieńska-Blauth J.: Wykrywanie aminokwasów w analizie chromatograficznej. *Chem. Anal.*, **2**, 1957, 123.
- [18] Opieńska-Blauth J., Waksmundzki A., Kański M.: *Chromatografia*. PWN, Warszawa 1957.
- [19] Peak.: *From the HP bookshelf*. Hewlett Packard, **4**, 1992.
- [20] Sanecka-Obacz M.: Przystosowanie testu ninhydryno-miedziowego do identyfikacji aminokwasów w płynach ustrojowych. *Chem. Anal.*, **6**, 1961, 419.
- [21] Skrabka T.: Chromatograficzny rozdział aminokwasów niektórych hydrolizatów z surowców odpadkowych przemysłu rolno-spożywczego. *Zesz. Nauk. WSE*, Wrocław 1963, 111.
- [22] Skrabka-Błotnicka T., Rosiński A., Przysiężna E.: The effect of dietary formulation supplemented with herbal mixture on the goose breast muscle quality. Report 1: The effect on the chemical composition. *Arch. Geflügelk.*, **61** (3), 1997, 135.
- [23] Suprynowicz Z., Różyło J.K., Kowalczyk S., Staszewski R., Malzacka M.: Ilościowa analiza chromatograficzna cieczowa i gazowa. PAN 1973.
- [24] Szyszko E.: *Instrumentalne metody analityczne*. PZWL, Warszawa 1975.
- [25] Tyszkiewicz S. (red.): *Postęp w analizie żywności*. Wyd. IPMiT, Warszawa 1993.
- [26] Żegota A., Żegota H.: Chromatograficzny rozdział izomerów tyrozyny. O-tyrozyna jako produkt radiacyjnej hydroksylacji fenyloalaniny i wskaźnik napromieniowania żywności. *Żywność. Technologia. Jakość.*, **4** (13), 1997, 37.

**REVIEW OF CHROMATOGRAPHIC METHODS
USED FOR ANALYSIS OF AMINO ACIDS**

S u m m a r y

The review of the chromatographic methods (paper, thin-layer, electrochromatography, gas, liquid – column and high pressure liquid chromatography) used for the analysis of amino acids in the paper is presented. The method with using of the Hewlett Packard's HPLC chromatograph AminoQuant 1090 series II with a diode array detector is especially exhibited. ☒

JOANNA SOBOLEWSKA, JACEK ROŻNOWSKI, TERESA FORTUNA

OZNACZANIE ZAWARTOŚCI WITAMIN A I E METODĄ WYSOKOSPRAWNEJ CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ (HPLC) W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH

Streszczenie

W publikacji opisano oznaczanie zawartości podstawowych form witamin A i E w margarynie i kiełbasie pasztetowej, przy wykorzystaniu HPLC w odwróconym układzie faz, z zastosowaniem detektora UV-VIS. Zwrócono szczególną uwagę na wpływ sposobu przygotowania próbki na oznaczaną zawartość substancji (optymalizacja warunków zmydlania). Dokonano statystycznego opracowania wyników na przykładzie badanej margaryny i wyznaczono współczynniki zmienności (*RSD*) dla obu witamin.

Wstęp

Pod określeniem *witamina A* rozumie się dwie grupy związków: witamina A₁ (retinol, dawniej zwany akseroftolem), witamina A₂ (3,4-didehydroretinol; 3-dehydroretinol) wraz z ich biologicznie czynnymi izomerami, pochodnymi aldehydowymi, kwasowymi i estrowymi [11].

Metody biologiczne oznaczania witaminy A polegają na podawaniu jej preparatów (w postaci prowitamin i witamin) szczurom wykazującym wyraźne objawy hipowitaminozy. Zaletą tego postępowania jest wszechstronna ocena preparatu, gdyż wyniki zależą nie tylko od aktywności składników preparatu, ale również od ich przyswajalności [6]. Metody fizykochemiczne stosowane do oznaczania tej witaminy są metodami spektrofotometrycznymi, fluorescencyjnymi lub chromatograficznymi. Wśród metod opartych na pomiarze natężenia promieniowania, największą czułością charakteryzuje się metoda fluorymetryczna ($\lambda_{wzb} = 480 \text{ nm}$) [6, 10], lecz wymaga ona chromatograficznego oczyszczenia próbki w celu usunięcia przede wszystkim barwników

polienowych. Metoda Carr-Price'a oparta jest na reakcji witaminy A i jej estrów z chlorkiem antymonu(III) [4, 6, 10] lub kwasem trichloro- lub trifluorooctowym [6, 10], w której następuje przesunięcie pasma absorpcji wiązań podwójnych, a powstający kompleks ma szybko zanikające niebieskie zabarwienie ($\lambda = 620$ nm). Trzykrotnie mniej czułą i wymagającą znacznie bardziej czystych roztworów jest metoda pomiaru absorbancji próbki alkoholowej ($\lambda = 325$ nm) [4, 10]. Znaczny wzrost czułości następuje po uprzednim oczyszczeniu na kolumnie chromatograficznej w odwróconym układzie faz. Zasada ta jest podstawą analizy chromatograficznej wykorzystującej detektor UV [6, 7].

Nazwa *witamina E* obejmuje rodzinę tokoferoli, czyli metylowanych pochodnych [11]:

- tokolu (2-metylo-2(4',8',12'-trimetylotridecylo)-6-hydroksychromanu),
- tokotrienolu (2-metylo-2(4',8',12'-trimetylotridecylo-3',7',11'-trienilo)-6-hydroksychromanu).

Metody biologiczne oznaczania witaminy E polegają na podawaniu samicom szczurów, hodowanych na diecie bez tokoferolu, karmy zawierającej określoną ilość tej witaminy. W przypadku gdy dawka jest większa od pewnej wartości progowej, ciąża przebiega i kończy się normalnie. Metoda ta jest bardzo specyficzna i wystarczająco dokładna, chociaż bardzo czasochłonna [6]. Fizykochemicznymi metodami są: spektrofotometryczne oznaczanie czerwono zabarwionego kompleksu Fe^{2+} (powstającego w reakcji tokoferoli z Fe^{3+}) i 2,2'-bipirydyłu (reakcja Emmerie-Engel) [4, 10]. Stężenie kompleksu jest proporcjonalne do zawartości tokoferolu. Po zastąpieniu bipirydyłu batofenantroliną (4,7-difenylo-1,10-fenantroliną), następuje zwiększenie czułości metody [10]. Miareczkowanie czystego α -tokoferolu można prowadzić używając jako titranta alkoholowego roztworu siarczanu(VI) ceru(IV) wobec difenylaminy jako wskaźnika [6]. Koniec miareczkowania wskazuje pojawienie się niebieskiego zabarwienia. Analiza próbek spożywczych musi zostać poprzedzona rozdzieleniem α -tokoferolu od innych substancji towarzyszących np. za pomocą cieczerwowej chromatografii kolumnowej, bibułowej lub cienkowarstwowej. Bardzo przydatna jest metoda HPLC, a rozdzielone związki można identyfikować kolorymetrycznie, spektrofotometrycznie czy spektrofotometrycznie [4, 6].

Analiza chromatograficzna

Ze względu na właściwości fizykochemiczne witamin A i E możliwe jest przeprowadzenie równoczesnej analizy obu witamin stosując metodę HPLC. Ponieważ witaminy te są wyjątkowo wrażliwe na działanie światła, obecność tlenu, temperaturę i środowisko zasadowe, od pierwszego etapu analizy należy zwracać szczególną uwagę

na sposób jej prowadzenia, aby nie przyczynić się do rozkładu substancji oznaczanych [9, 12].

Początkowo, przy użyciu alkoholowego roztworu wodorotlenku potasu o stężeniu 60–80%, prowadzi się zmydlanie frakcji tłuszczowej, w której witaminy są rozpuszczone [2, 9, 12]. Często zalecane jest wykonanie wcześniejszej ekstrakcji tłuszczu metodą Soxhleta [8, 9, 12]. Należy pamiętać o dodaniu przeciwutleniaczy, którymi mogą być: kwas askorbinowy, pirogallol, hydrochinon, BHT (butylohydroksytoluen). Zalecane jest przeprowadzanie procesu zmydlania w atmosferze gazu obojętnego [1, 2, 9, 12]. Niektórzy autorzy podają, że czas zmydlania powinien wynosić od 20 do 40 minut w temperaturze 70°C [4, 12], a nawet wyższej. Inni zaś twierdzą, że warunki te są zbyt agresywne i zalecają zmydlanie w temperaturze pokojowej przez całą dobę [1, 12].

Po etapie uwolnienia witamin z próbki przeprowadza się ich ekstrakcję. Najczęściej używa się heksanu, chloroformu, eteru etylowego lub nafty. W celu usunięcia resztek mydeł, po zebraniu ekstraktu przemywa się go wodą, do momentu, aż woda po płukaniu nie będzie wykazywała odczynu zasadowego (nie zabarwi fenoloftaleiny) [1, 4, 12]. Następnie ekstrakt witamin zagęszcza się na wyparce próżniowej. Ostatecznie pozostałość po destylacji rozpuszcza się w niewielkiej ilości fazy ruchomej.

Nowoczesne metody przygotowania próbki, do których należy ekstrakcja do fazy stałej (SPE) pozwalają na eliminację procesu zmydlania [2]. Dzięki temu można oznaczyć równocześnie wszystkie formy wolnych witamin, w tym także ich formy estrowe.

Do oznaczenia witamin A i E mogą służyć zestawy do HPLC, pracujące zarówno w normalnym układzie faz (NP) lub w odwróconym układzie faz (RP) [9, 10, 12]. W tych pierwszych, fazę ruchomą stanowi heksan – często z dodatkiem chloroformu i związku bardziej polarnego np. 2-propanolu lub metanolu. Fazę ruchomą mogą tworzyć mieszaniny: heksan : 2-propanol (99,5 : 0,5) [7, 9], heksan : chloroform (85 : 15) [13]. W przypadku odwróconego układu faz, eluentem może być metanol lub jego mieszanina z wodą, acetonitrylem, kwasem octowym [1, 9, 14]. Do detekcji używa się najczęściej detektorów UV-VIS [1, 3, 7, 8, 12] oraz spektrofluorocencyjnych [9], a dla bardzo niskich stężeń - elektrochemicznych [2].

Materiał i metody badań

Materiałem badawczym były margaryna Flora wyprodukowana przez Unilever Polska S.A. oraz kiełbasa paszтетowa z Zakładów Mięśnych „IGAR” w Rabce. Zawartość analizowanych witamin A i E oznaczono przy użyciu zestawu do wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej firmy Merck Hitachi w odwróconym układzie faz przy użyciu kolumny LiChrosfer®100 (250×4,6 nm) z przedkolumną. Detekcję spektrofotometryczną do oznaczania witaminy A wykonano przy długości fali $\lambda = 325$ nm,

a w przypadku witaminy E – $\lambda = 290$ nm. Jako eluentu użyto metanolu (czystość do HPLC firmy Merck) o szybkości przepływu 2 ml/min. Analizę wykonano w temperaturze pokojowej. Substancjami użytymi do wykonania krzywej kalibracyjnej były czyste chemicznie formy witamin o największej aktywności biologicznej: trans-retinol (Sigma min. 95%) – wzorzec witaminy A i α -tokoferol (Sigma min. 95%) – wzorzec witaminy E.

Do analizy ilościowej zastosowano metodę wzorca zewnętrznego, nastrzykując kolejno metanolowe roztwory oznaczanej witaminy w dawkach o rosnącym stężeniu w zakresie $3,12 \div 500,00 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ dla witaminy A. Dla witaminy E zakres stężeń wynosił $6,25 \div 1000,00 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Postępowanie takie pozwala wyznaczyć funkcyjną zależność powierzchni pod pikiem chromatograficznym, od stężenia odpowiedniej witaminy w próbce.

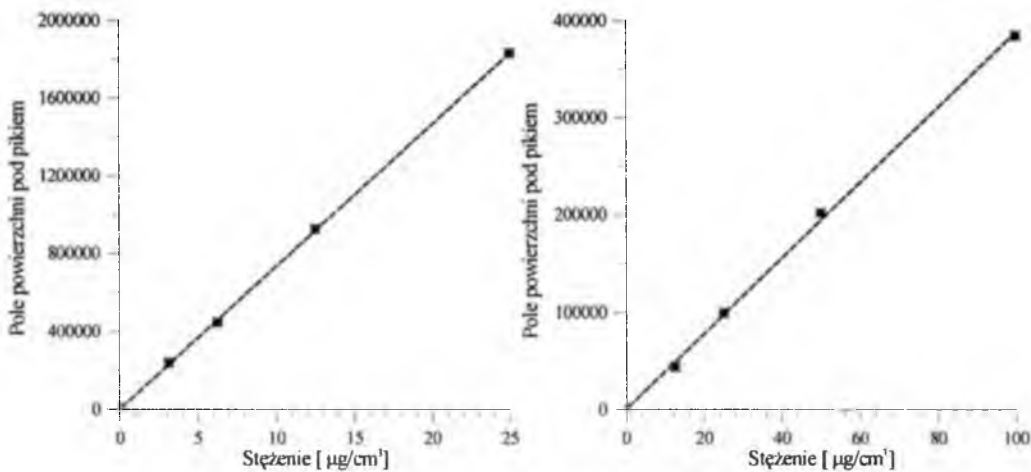
Przygotowanie próbki gotowej do nastrzyku składało się z następujących etapów: izolacji witamin w procesie zmydlania, ekstrakcji, zagęszczania próbki i odpowiedniego rozcieńczenia analitu.

Na etapie zmydlania potraktowano próbkę alkoholowym roztworem wodorotlenku potasu z dodatkiem hydrochinonu jako przeciwutleniacza, wytrząsano z częstotliwością 150 obr/min w temperaturze 45°C przez 60 min, po czym podniesiono temperaturę do 70°C i zmydlano do momentu uzyskania jednorodnej mieszaniny. Po ostudzeniu zmydlonej próbki do temperatury pokojowej, prowadzono trzykrotnie ekstrakcję mieszaniną heksan : chloroform (2:1; v/v). W celu usunięcia mydeł, otrzymany ekstrakt przepłukano 3–4 razy wodą destylowaną wytrząsając go w rozdzielaczu. Ekstrakt osuszono z pozostałości wody sącząc go pod próżnią przez sączek Schotta wypełniony bezwodnym siarczanem(VI) sodu. Następnie odparowano rozpuszczalnik w rotacyjnej wyparce próżniowej w temperaturze 50°C . Zagęszczony ekstrakt witaminowy odpowiednio rozcieńczono w metanolu i przesączono przez karbowany sączek z bibuły (prod. POCh – o średniej szybkości sączenia) do kolby miarowej. Tak przygotowany ekstrakt nastrzykiwano na kolumnę.

Wyniki i dyskusja

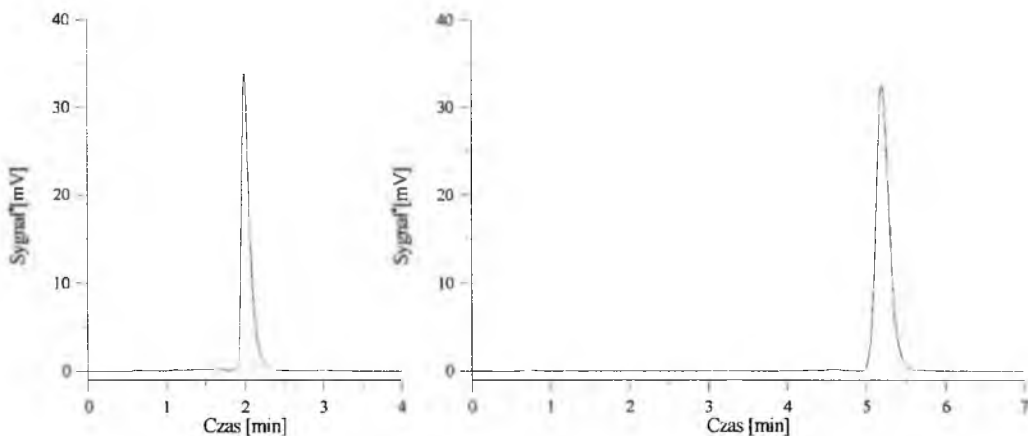
Sporządzone krzywe kalibracyjne pozwalają określić czasy retencji analizowanych witamin oraz wyznaczyć współczynniki korelacji liniowej.

Zakres liniowości krzywych kalibracyjnych (rys. 1) ze współczynnikami korelacji $R > 0,99$ dla witaminy A wynosi $3,12 \div 500,00 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, a dla witaminy E $6,25 \div 1000,00 \mu\text{g}/\text{cm}^3$. Czas retencji wzorca witaminy A wynosi 2,00 min, a witaminy E 5,20 min. Typowe chromatogramy substancji wzorcowych przedstawiono na rys. 2.



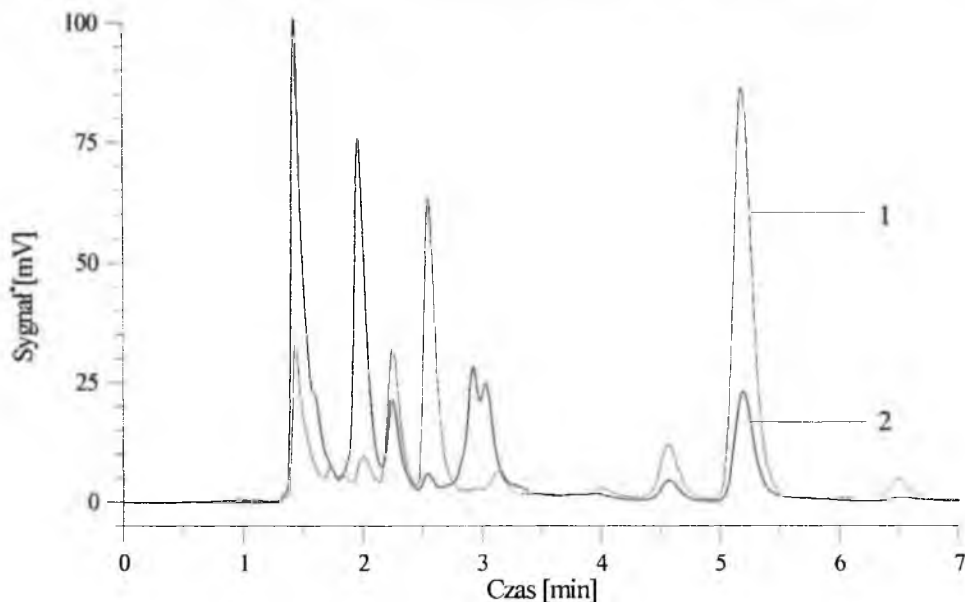
Rys. 1. Krzywe kalibracyjne: 1 – trans-retinolu ($\lambda = 325$ nm), 2 – α -tokoferolu ($\lambda = 290$ nm).
 * absorbancja jest wyrażona w jednostkach napięcia [mV] sygnału analogowego wysyłanego na rejestrator.

Fig. 1. Calibration curves: 1 – axophterol ($\lambda = 325$ nm), 2 – α -tocopherol ($\lambda = 290$ nm).
 * absorbance was expressed as voltage unit [mV] of an analog signal sent to data recorder.



Rys. 2. Chromatogramy wzorców: 1 – trans-retinolu ($\lambda = 325$ nm), 2 – α -tokoferolu ($\lambda = 290$ nm).

Fig. 2. HPLC chromatograms of standards: 1 – axophterol ($\lambda = 325$ nm), 2 – α -tocopherol ($\lambda = 290$ nm).



Rys. 3. Chromatogram ekstraktu witaminy E z margaryny ($\lambda = 290$ nm): 1 – optymalne warunki zmydlenia, 2 – nieoptymalne warunki zmydlenia.

Fig. 3. HPLC chromatogram of vitamin E extract from margarine ($\lambda = 290$ nm): 1 – optimal saponification conditions, 2 – unoptimal saponification conditions.

Dostępne metody oznaczania witamin A i E metodą HPLC w układzie odwróconych faz podają czas retencji dla witaminy A w zakresie 0,95÷5,5 min, natomiast dla witaminy E – 1,3÷19,0 min [1, 9, 10]. Rozpiętość czasów retencji jest dość duża, co jest szczególnie widoczne w przypadku witaminy E. Fakt ten można tłumaczyć stosowaniem rozmaitych eluentów, zawierających różne proporcje wody, metanolu, a nawet acetonitrylu [1, 3, 7, 8, 9, 13].

Oznaczona zawartość witaminy A w badanej margarynie wynosiła 924 $\mu\text{g}/100$ g, w kiełbasie paszтетowej 3256 $\mu\text{g}/100$ g, natomiast zawartość witaminy E odpowiednio: 31 $\text{mg}/100$ g i 0,24 $\text{mg}/100\text{g}$. Wyniki zawartości witamin A i E w margarynie porównano z ilościami deklarowanymi przez producenta na opakowaniu (tab. 1). Porównano je także z wartościami podanymi w tabelach składu i wartości odżywczych [5], które w odniesieniu do 100 g margaryny wynoszą: 600 μg witaminy A oraz 31,51 mg witaminy E. W tablicach brak jest pozycji "kiełbasa paszтетowa". Ponieważ składa się ona głównie z podrobów i wątroby wieprzowej, tę ostatnią przedstawiono poniżej; opisana wątroba zawiera średnio około 2931 μg witaminy A (wartość bliska w oznaczonej próbce) oraz 0,11 mg witaminy E (wartość dwukrotnie niższa od oznaczonej) [5].

Na podstawie siedmiu powtórzeń analizy margaryny (od etapu pobrania próbki, do właściwego oznaczenia chromatograficznego) oszacowano precyzję metody. Uzyskane wyniki pozwoliły wyznaczyć odchylenia standardowe s oraz względne odchylenia standardowe (współczynniki zmienności) RSD . Wyniki zestawiono w tab. 1.

Tabela 1

Deklarowane na opakowaniu i średnie oznaczone zawartości witamin A i E w margarynie, wraz z odchyleniami standardowymi i współczynnikami zmienności.

Declared at consumer package and mean chromatographically determined contents of vitamins A and E in margarine, their standard deviations and coefficients of variation.

Substancja oznaczana Component	Zawartość / Content		Odchylenie standardowe Standard deviation (s)	Współczynnik zmienności Coefficient of variation (RSD) [%]
	deklarowana declared	oznaczona determined		
witamina A vitamin A [$\mu\text{g}/100\text{g}$]	900	924	72,80	7,88
witamina E vitamin E [$\text{mg}/100\text{g}$]	26	31	2,35	7,55

Podczas analizy chromatogramów zwrócono uwagę na wpływ warunków zmydlenia, na wyznaczoną zawartość witamin. Obrazuje to rys. 3. Chromatogram 1. (zaznaczony linią ciągłą) obrazuje analizę próbki zmydlanej w temperaturze 45°C przez 60 min. Po tym czasie temperaturę podniesiono do 70°C , a proces został zakończony po uzyskaniu jednorodnej mieszaniny. Natomiast chromatogram 2. (zaznaczony linią przerywaną) został wykonany dla próbki zmydlanej przez dłuższy okres czasu (powyżej 1,5 godziny), w temperaturze powyższej 70°C . Czasy retencji dla odpowiadających sobie pików w obu przypadkach są takie same, natomiast zmieniają się proporcje ich wielkości (3,8 : 1 w przypadku α - tokoferolu). Sugeruje to powstawanie tych samych produktów, lecz w innych proporcjach. W przypadku oznaczania witaminy A prowadzenie analizy w warunkach nieprawidłowych skutkuje zmniejszeniem wielkości pików o 42%.

Na chromatogramie witaminy E oprócz pików charakterystycznych dla tej witaminy ($t_{\text{ret}} = 5,2$ min), widoczny jest pik witaminy A ($t_{\text{ret}} = 2$ min). Niestety, z powodu obecności wielu innych pików o podobnych czasach retencji ($t = 1,2 \pm 2,5$ min) nie można określić jednoznacznie stężenia retinolu przy tej długości fali ($\lambda = 290$ nm).

Wnioski

1. Adaptowana metoda oznaczania witamin A i E, dzięki dobrej powtarzalności i dokładności uzyskanych wyników, może znaleźć zastosowanie w ilościowym oznaczaniu witamin w produktach spożywczych; decydujący wpływ na powtarzalność wyników ma etap przygotowania próbki.
2. Duży wpływ na oznaczaną zawartość witamin A i E ma temperatura i długość procesu zmydlania próbki.

LITERATURA

- [1] Albalá-Huratta S., Novella-Rodríguez S.: Determination of vitamins A and E in infant milk formulae by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **778**, 1997, 243.
- [2] Delgado Zamarreno M., Sanchez Perez A.: Determination of fat-soluble vitamins in yogurt by HPLC with electrochemical detection. *Talanta*, **43**, 1996, 1555.
- [3] Hewavitharana A.: Simultaneous Liquid Chromatographic Determination of Vitamins A, E and β -carotene in Common Dairy Foods. *International Dairy Journal*, **6**, 1996, 613.
- [4] Krelowska-Kułas M.: Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa 1993.
- [5] Łoś-Kuczera M. (red.): Produkty spożywcze. Skład i wartość odżywcza. Instytut Żywności i Żywienia im. Prof. A. Szczygła, Warszawa 1990.
- [6] Moszczyński P., Pyć R.: Biochemia witamin. Część II. Witaminy lipofilne i kwas askorbinowy. PWN, Warszawa, Łódź 1999.
- [7] Mulholland M., Dolphin R.: Analysis of the fat-soluble vitamins using narrow bore high-performance liquid chromatography with multichannel UV-VIS detection. *Journal of Chromatography*, **350**, 1995, 285.
- [8] Pikkariainen S., Parviainen M.: Determination of retinyl palmitate and total vitamin A content in liver and liver-based ready-to-eat foods. *Journal of Chromatography*, **577**, 1992, 163.
- [9] Rizzolo A., Polesallo S.: Chromatographic determination of vitamins in foods. *Journal of Chromatography*, **624**, 1992, 103.
- [10] Rutkowska U. (red.): Wybrane metody badania składu i wartości odżywczej żywności. PZWL, Warszawa 1981.
- [11] Sikorski Z. (red.): Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności. WNT, Warszawa 1996.
- [12] Tyszkiewicz S. (red.): Postęp w analizie żywności. Tom I, Warszawa 1990.
- [13] Widicus W., Kirk J.: High Pressure Liquid Chromatographic determination of vitamins A and E in cereal products. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, **62**, 1979, 637.
- [14] Vinãs P., Campillo N.: Liquid chromatographic determination of fat-soluble vitamins in paprika and paprica oleoresin. *Food Chemistry*, **45**, 1992, 349.

DETERMINATION OF VITAMINS A AND E IN SOME FOOD PRODUCTS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC)

S u m m a r y

This paper describes the determination of basic forms of vitamins A and E in margarine and liver sausage using reversed phase of HPLC with UV-VIS detection. Special attention was paid on influence of sample preparation on appointed content of substance (optimization of saponification conditions). Also statistical data analysis, based on margarine analysis and relative standard deviation (*RSD*) for both vitamins was performed. ☒

ELIZA GRUCZYŃSKA, KATARZYNA MACIASZEK

PRZEESTRYFIKOWANIE JAKO METODA MODYFIKACJI WŁAŚCIWOŚCI LIPIDÓW

Streszczenie

Mieszaninę oleju rzepakowego i łoju wołowego (1:1) przeestryfikowano w obecności biokatalizatorów – Lipozyme IM i Novozym 435 oraz katalizatora chemicznego – metanolanu sodu. Porównywano właściwości fizykochemiczne otrzymanych produktów. Przeestryfikowanie spowodowało wzrost zawartości składników polarnych i liczby kwasowej oraz obniżenie temperatury mięknięcia i zawartości fazy stałej. Największą zawartością frakcji polarnej charakteryzował się produkt przeestryfikowania chemicznego. Wartości liczb kwasowych wszystkich produktów reakcji były podobne. Najniższą temperaturę mięknięcia miał produkt przeestryfikowania chemicznego i produkt reakcji katalizowanej preparatem Novozym 435. Najlepsze właściwości fizykochemiczne miał produkt przeestryfikowania w obecności Novozym 435.

Wstęp

Przeestryfikowanie, obok uwodornienia i frakcjonowania, jest jedną z metod modyfikacji struktury i właściwości tłuszczów. Reakcja ta zachodzi w obecności katalizatorów chemicznych lub biologicznych. W wyniku przeestryfikowania zmienia się struktura triacylogliceroli, nie występują natomiast zmiany w budowie kwasów tłuszczowych, jak to ma miejsce w procesie uwodornienia. Przeestryfikowanie różnych naturalnych i modyfikowanych tłuszczów może być sposobem otrzymania tłuszczów, bez izomerów trans, wykorzystywanych do komponowania osnów margarynowych lub użytkowanych jako tłuszcze smaźalnicze [9, 10]. Proces ten stwarza możliwości uzyskania tłuszczów o programowanych właściwościach fizykochemicznych, tzn. o pożądanej temperaturze topnienia i zawartości fazy stałej [5].

Celem pracy było zbadanie wpływu reakcji chemicznego i enzymatycznego przeestryfikowania na właściwości fizykochemiczne mieszaniny łożu wołowego i oleju rzepakowego.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły niskoerukowy olej rzepakowy (Zakłady Tłuszczowe „Kruszwica” S.A.) oraz łój wołowy (Masarnia „Ratyński i synowie” s.c.) zmieszane w stosunku wagowym 1:1.

W procesie przeestryfikowania stosowano trzy rodzaje katalizatorów:

- immobilizowana lipaza z *Mucor miehei* o nazwie handlowej Lipozyme IM (Novo Nordisk, Dania), specyficzna w stosunku do wiązań estrowych w pozycji sn-1,3 triacylogliceroli; zawartość wody w enzymie wynosiła 3%,
- immobilizowana lipaza z *Candida antarctica* o nazwie handlowej Novozym 435 (Novo Nordisk, Dania), niespecyficzna względem wiązań estrowych w triacyloglicerolach; zawartość wody w enzymie wynosiła 2%,
- metanolan sodu (Merck, Niemcy).

Przeestryfikowanie chemiczne

Substraty reakcji osuszano pod zmniejszonym ciśnieniem i dodawano sproszkowany metanolan sodu w ilości 1%, w przeliczeniu na masę mieszaniny tłuszczowej. Czas trwania reakcji wynosił 1,5 godziny, a temperatura procesu 90°C. Reakcję przerywano przez dodanie gorącej wody zakwaszonej kwasem ortofosforowym w celu rozłożenia katalizatora. Przeestryfikowaną mieszaninę tłuszczową poddano ekstrakcji eterem dietylowym. Otrzymany produkt suszono bezwodnym siarczanem magnezu, a następnie oddestylowano rozpuszczalnik.

Przeestryfikowanie enzymatyczne

Substraty reakcji osuszano pod zmniejszonym ciśnieniem i dodawano enzym w ilości 8% w stosunku do mieszaniny tłuszczowej. Reakcja katalizowana preparatem Lipozyme IM trwała 8 godzin, a temperatura procesu wynosiła 60°C. Czas reakcji katalizowanej preparatem Novozym 435 wynosił 4 godziny, a temperatura procesu 80°C. Proces przerywano przez odsączenie enzymu od przeestryfikowanego tłuszczu. Po zbadaniu wpływu temperatury, czasu reakcji i stopnia uwodnienia katalizatora przedstawione wyżej warunki wykonywania reakcji uznano za optymalne.

Isolacja czystych triacylogliceroli metodą chromatografii kolumnowej

Oddzielenie triacylogliceroli od niepełnych acylogliceroli i wolnych kwasów tłuszczowych wykonywano za pomocą chromatografii kolumnowej zgodnie z AOAC 1990 (metoda nr 982.27). Kolumnę chromatograficzną wypełniano żelom krzemion-

kowym (silica gel 60, 70–230 mesh, Merck) i наносzono produkty przeestryfikowania. Triacyloglicerole eluowano z kolumny za pomocą mieszaniny eteru naftowego i dietylowego (87:13), natomiast niepełne acyloglicerole i wolne kwasy tłuszczowe za pomocą eteru dietylowego.

W mieszaninie fizycznej oraz w produktach jej przeestryfikowania oznaczano: liczbę kwasową, zawartość składników polarnych, temperaturę mięknięcia oraz zawartość fazy stałej w funkcji temperatury.

Oznaczanie liczby kwasowej

Liczbę kwasową oznaczano metodą miareczkową wg PN-60/A-86921.

Oznaczanie zawartości składników polarnych

Zawartość składników polarnych oznaczano metodą chromatografii kolumnowej wg AOAC 1990 (metoda nr 982.27). Na kolumnę chromatograficzną wypełnioną żelalem krzemionkowym (silica gel 60, 70–230 mesh) наносzono produkty przeestryfikowania. Składniki polarne wymywano z kolumny za pomocą eteru dietylowego.

Oznaczanie temperatury mięknięcia

Temperaturę mięknięcia oznaczano we frakcji triacyloglicerolowej metodą kapilary otwartej wg PN-60/A-86919.

Oznaczanie zawartości fazy stałej

Zawartość fazy stałej w funkcji temperatury we frakcji triacyloglicerolowej badano metodą pulsacyjnego magnetycznego rezonansu jądrowego stosując aparat NMS 100 Minispec firmy Bruker. Oznaczenie to wykonano w laboratorium Zakładów Przemysłu Tłuszczowego w Warszawie.

Wyniki i dyskusja

W procesie przeestryfikowania zachodzą dwie przeciwstawne reakcje: hydroliza i estryfikacja [5, 9].

Analizując wartości liczb kwasowych otrzymanych produktów przeestryfikowania (tab. 1) stwierdzono, że produkt otrzymany przy użyciu katalizatora niespecyficznego pozycyjnie – Novozym 435 ma najmniejszą liczbę kwasową wynoszącą 5,5 mg KOH/g. Wyższymi wartościami liczb kwasowych charakteryzują się: produkt przeestryfikowania chemicznego – 6,5 mg KOH/g i produkt otrzymany przy użyciu katalizatora specyficznego pozycyjnie – Lipozyme IM, wynoszącą 6,4 mg KOH/g.

Proces hydrolizy powoduje, że w uzyskanych produktach obok triacylogliceroli znajdują się również pewne ilości składników polarnych, czyli wolnych kwasów tłuszczowych, diacylogliceroli i monoacylogliceroli [11]. Porównując udziały procentowe

frakcji polarnej w produktach przeestryfikowania (tab. 2) stwierdzono, że największą zawartością składników polarnych, wynoszącą 14,7% charakteryzuje się produkt przeestryfikowania chemicznego. Prawdopodobnie jest to spowodowane zastosowaniem dużej ilości metanolanu sodu. Poziom dozowania tego katalizatora stosowany przez wielu autorów mieści się w przedziale 0,2–1% [3, 7, 14, 15]. W pierwszym etapie reakcji formuje się aktywna postać katalizatora (diacyloglicerynian sodu) oraz powstają estry metylowe kwasów tłuszczowych [13]. Poprzez przerwanie reakcji wodą następuje rozkład katalizatora i tworzą się diacyloglicerole oraz wodorotlenek sodu.

Tabela 1

Porównanie wartości liczby kwasowej w mieszaninie wyjściowej i produktach przeestryfikowania.
The comparison of acid value in the initial mixture and interesterification products.

Rodzaj mieszaniny (The kind of mixture)	Liczba kwasowa (Acid value)
	mg KOH/g
Łój (Tallow)	0,9
Olej (Oil)	0,1
Mieszanina fizyczna (Initial mixture)	0,5
Produkt przeestryfikowania enzymatycznego (Lipozyme) (The product of enzymatic interesterification)	6,4
Produkt przeestryfikowania enzymatycznego (Novozym) (The product of enzymatic interesterification)	5,5
Produkt przeestryfikowania chemicznego (The product of chemical interesterification)	6,5

Najmniej składników polarnych zawiera produkt reakcji katalizowanej preparatem Novozym 435 (2,0%). Nieco większą zawartością frakcji nietriacyloglicerolowej charakteryzuje się produkt przeestryfikowania w obecności enzymu specyficznego (4,1%). W przypadku przeestryfikowania enzymatycznego zawartość składników polarnych jest ściśle związana z zawartością wody w początkowym układzie reakcyjnym [1, 2, 11, 12]. Wyższa zawartość frakcji polarnej w produkcie reakcji katalizowanej preparatem Lipozyme IM może być spowodowana większym stopniem uwodnienia katalizatora. Związane jest to z większą hydrolizą wiązań estrowych [6, 8].

Jednym z parametrów określających przydatność użytkową tłuszczów jest ich konsystencja. Najbardziej rozpowszechnionym wskaźnikiem konsystencji jest temperatura mięknięcia tłuszczu [4]. We frakcjach triacyloglicerolowych wyizolowanych z mieszanin preakcyjnych zaobserwowano obniżenie temperatury mięknięcia w porównaniu z mieszaniną wyjściową (tab. 3). Największe obniżenie temperatury mięk-

nięcia widoczne jest dla produktu przeestryfikowania chemicznego (spadek o 10°C). Podobnie wygląda produkt przeestryfikowania enzymatycznego w obecności biokatalizatora niespecyficznego. Najmniejsze obniżenie temperatury mięknięcia (spadek o 5°C) obserwujemy w przypadku frakcji triacyloglicerolowej wyizolowanej z produktu przeestryfikowania preparatem enzymu pozycyjnie specyficznego.

Tabela 2

Zawartość frakcji polarnej w mieszaninie wyjściowej i produktach przeestryfikowania.
Percentage of polar fraction in the initial mixture and interesterification products.

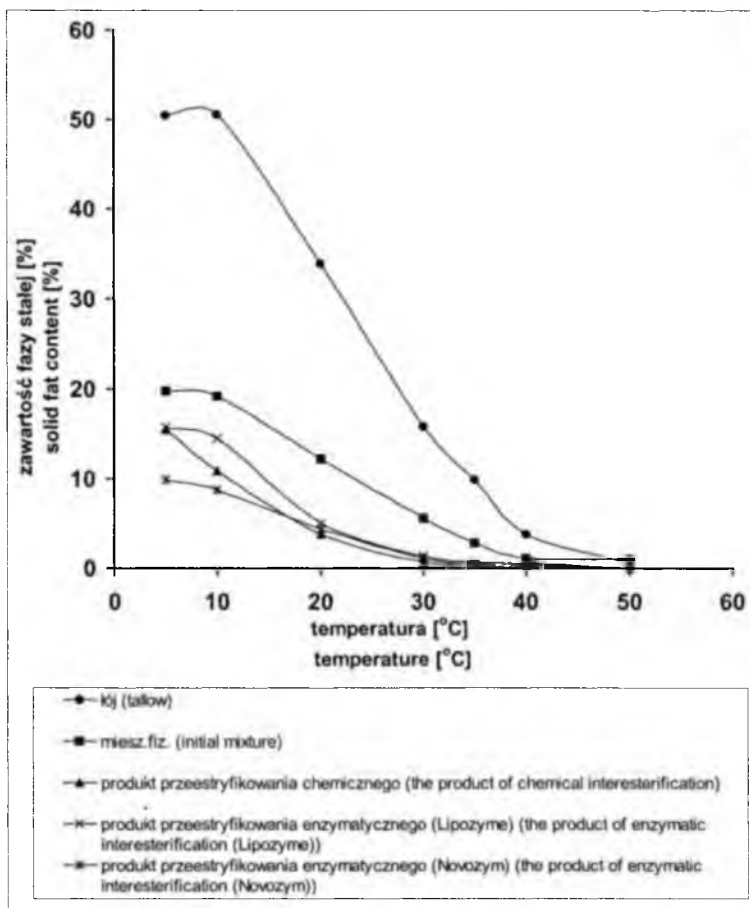
Rodzaj mieszaniny (The kind of mixture)	Frakcja polarna (Polar fraction)
	%
Łój (Tallow)	2,5
Olej (Oil)	0,6
Mieszanina fizyczna (Initial mixture)	1,5
Produkt przeestryfikowania enzymatycznego (Lipozyme) (The product of enzymatic interesterification)	4,1
Produkt przeestryfikowania enzymatycznego (Novozym) (The product of enzymatic interesterification)	2,0
Produkt przeestryfikowania chemicznego (The product of chemical interesterification)	14,7

Tabela 3

Temperatura mięknięcia mieszaniny wyjściowej i triacylogliceroli wyizolowanych z produktów reakcji.
Melting point of initial mixture and triacylglycerols isolated from reaction products.

Rodzaj mieszaniny (The kind of mixture)	Temp. mięknięcia (Melting point)
	°C
Łój (Tallow)	37,3
Mieszanina fizyczna (Initial mixture)	29,9
Produkt przeestryfikowania enzymatycznego (Lipozyme) (The product of enzymatic interesterification)	25,0
Produkt przeestryfikowania enzymatycznego (Novozym) (The product of enzymatic interesterification)	20,1
Produkt przeestryfikowania chemicznego (The product of chemical interesterification)	19,3

Przeestryfikowanie wpływa również na zawartość fazy stałej we frakcji niepolarniej wyizolowanej z mieszaniny poreakcyjnej. Analizując te zmiany w zakresie temperatur od 5 do 50°C (rys. 1) stwierdzono obniżenie zawartości fazy stałej we wszystkich produktach przeestryfikowania w porównaniu z mieszaniną wyjściową. W zakresie temperatur 5 - 20°C największe obniżenie zawartości fazy stałej, około 10%, obserwujemy, w produkcie przeestryfikowania w obecności preparatu Novozym 435. W przedziale temperatur od 20 do 50°C profile zawartości fazy stałej wszystkich produktów reakcji przeestryfikowania mają podobny przebieg. Spadek zawartości fazy stałej prawdopodobnie jest spowodowany zmniejszeniem stosunku wyżej topliwych triacylogliceroli do pozostałych w przeestryfikowanych mieszaninach.



Rys. 1. Zawartość fazy stałej w mieszaninie wyjściowej i frakcji triacyloglicerolowej wyizolowanej z produktów reakcji.

Fig. 1. Solid fat content in the initial mixture and triacylglycerols isolated from reaction products.

Podsumowanie

Podsumowując można stwierdzić, że zastosowanie różnych katalizatorów procesu przeestryfikowania pozwala uzyskać różne produkty końcowe. Przeestryfikowanie spowodowało wzrost zawartości składników polarnych i liczby kwasowej. Największą zawartością frakcji polarnej charakteryzował się produkt przeestryfikowania chemicznego. W produktach reakcji zachodzącej w obecności biokatalizatorów udział procentowy frakcji polarnej jest znacznie mniejszy. Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych we wszystkich otrzymanych produktach była porównywalna. We frakcji triacyloglicerolowej produktów przeestryfikowania zaobserwowano obniżenie temperatury mięknięcia oraz zawartości fazy stałej. Największe obniżenie temperatury mięknięcia w stosunku do mieszaniny wyjściowej wykazywał tłuszcz przeestryfikowany chemicznie oraz produkt reakcji katalizowanej enzymem niespecyficznym. Można stwierdzić, że najlepszymi właściwościami fizykochemicznymi charakteryzował się tłuszcz uzyskany w wyniku reakcji zachodzącej w obecności katalizatora niespecyficznego.

LITERATURA

- [1] Foglia T.A., Petruso K., Fearheller S.H.: Enzymatic interesterification of tallow-sunflower oil mixtures. *JAOCS*, **70**, 1993, 281.
- [2] Forssell p., Kervinen R., Lappi M., Liko P., Suorti T., Poutanen K.: Effect of enzymatic interesterification on the melting point of tallow-rapeseed oil (LEAR) mixture. *JAOCS*, **69**, 1992, 126.
- [3] Gavriilidou V., Boskou D.: Chemical interesterification of olive oil-tristearin blends for margarines. *International Journal of Food Science and Technology*, **26**, 1991, 451.
- [4] Jakubowski A.: Przeestryfikowanie jako metoda modyfikacji konsystencji tłuszczów. *Tłuszcze Jadalne*, **28**, 1990, 21.
- [5] Ledóchowska E.: Zastosowanie enzymatycznego przeestryfikowania do modyfikacji tłuszczów. *Tłuszcze Jadalne*, **30**, 1995, 43.
- [6] Ledóchowska E., Datta I.: Optimization of enzymatic interesterification of fats to increase the content of triacylglycerols in the reaction product. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **7/48**, 1998, 683.
- [7] Lo Y.C., Handel A.P.: Physical and chemical properties of randomly interesterified blends of soybean oil and tallow for use as margarine oils. *JAOCS*, **60**, 1983, 815.
- [8] MacKenzie A.D., Stevenson D.E.: Modification of the nutritional properties of fats using lipase catalysed directed interesterification. *Biotechnology Letters*, **17**, 1995, 383.
- [9] Marangoni A.G., Rousseau D.: Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. *Trends in Food Science and Technology*, **6**, 1995, 329.
- [10] Mohamed H.M.A., Bloomer S., Hammadi K.: Modification of fats by lipase interesterification I: Changes in glyceride structure. *Fat Sci. Technol.*, **11**, 1993, 428.
- [11] Quinlan P., Moore S.: Modification of triglycerides by lipases: process technology and its application to the production of nutritionally improved fats. *Inform*, **4**, 1993, 580.

- [12] Rousseau D., Marangoni A.G.: Tailoring the textural attributes of butter fat / canola oil blends via *Rhizopus* lipase-catalyzed interesterification. 1. Compositional modifications. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1998, 2368.
- [13] Rozendaal A.: Interesterification of oil and fats. *Inform*, **3**, 1992, 1232.
- [14] Schmidt S., Hurtova S., Zemanovic J., Sekretar S., Simon P., Ainsworth P.: Preparation of modified fats from vegetable oil and fully hydrogenated vegetable oil by randomization with alkali catalysts. *Food Chemistry*, **55**, 1996, 343.
- [15] Sreenivasan B.: Interesterification of fats. *JAOCS*, **55**, 1978, 796.

INTERESTERIFICATION AS A METHOD OF MODIFICATION OF PROPERTIES OF LIPID

S u m m a r y

A mixture of low erucic acid rapeseed oil and beef tallow (1:1) has been used for interesterification in the presence of two biocatalysts – Lipozyme IM, Novozym 435 and chemical catalyst – sodium methoxide. The physico-chemical properties of interesterified fats have been compared. The increase of polar compounds content and acid value and the decrease of melting point and solid fat content have been observed. The product of chemical interesterification is characterized by the highest polar fraction content. The acid values of all the products are similar to one another. The triacylglycerol fraction isolated from the fat after chemical and Novozym 435 catalyzed interesterification are both characterized by the lowest melting point. ☒

JOANNA MILALA, BOGUSŁAW KRÓL

ZASTOSOWANIE TLC I HPLC W ANALIZIE JAKOŚCIOWEJ SAPONIN

Streszczenie

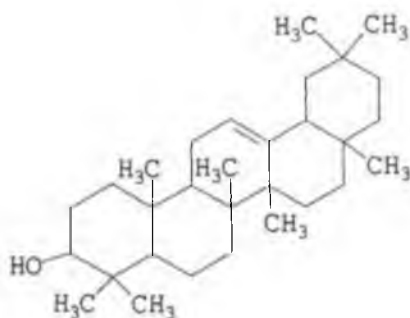
Metodą chromatografii cieczowej cienkowarstwowej TLC porównano skład jakościowy wybranych saponin i produktów ich hydrolizy kwasowej (aglikonów). Dobrano warunki rozdziału: glicyryzyny, saponiny białej i saponin z buraka cukrowego metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC z zastosowaniem metanolu, jako głównego rozpuszczalnika.

Stwierdzono, że zastosowanie chromatografii cieczowej TLC i HPLC umożliwia udokumentowanie ogromnego zróżnicowania składu jakościowego i ilościowego badanych saponin. Dobry rozdział saponin z grupy glukuronidów metodą HPLC uzyskuje się przy elucji metanolem w fazie z dodatkiem TBA (wodorotlenek tetrabutylamonowy) o indywidualnie dobranym udziale metanolu.

Wstęp

Saponiny (łac. *sapo-mydło*) są to glikozydy pochodzenia roślinnego wykazujące silne właściwości pianotwórcze. Zalicza się je do grupy wtórnych metabolitów przemian biochemicznych roślin. Pod względem budowy chemicznej saponiny należą do glikozydów triterpenoidowych lub steroidowych, które w wyniku wyczerpującej hydrolizy kwasowej, zasadowej lub enzymatycznej ulegają rozpadowi na aglikony (*sapogeniny*) oraz składniki cukrowe (pentozy, heksozy lub kwasy uronowe).

Podstawowym aglikonem saponin triterpenoidowych jest β -amyryna (rys. 1), która może mieć różne podstawniki (grupy: hydroksylowe, karboksylowe, ketonowe, metoksyłowe i estrowe). Występowanie przy aglikonach różnych grup funkcyjnych, a także możliwość różnych połączeń między cukrowcami i aglikonem, sprawia, iż w przyrodzie znajduje się olbrzymia ilość saponin różniących się strukturą i właściwościami [3, 4, 6]. Dokładnie poznanymi i opisanymi w literaturze są saponiny wyizolowane z soi, korzenia żeń-szeń, mydlnicy lekarskiej, lucerny.



Rys. 1. Chemiczna struktura β -amyryny.

Fig. 1. Chemical structures of β -amyrin.

Chemiczną strukturę wybranych saponin triterpenoidowych przedstawiono w tab. 1 [1, 6, 7].

Wyodrębnianie i oczyszczanie poszczególnych saponin z surowców roślinnych jest trudne, ponieważ mają one silne właściwości adsorpcyjne, powlekające, pieniające, łatwo tworzą związki kompleksowe z barwnikami, cholesterolem i innymi związkami chemicznymi. Ponadto bardzo trudno ulegają krystalizacji. Wykazują też różną podatność na działanie kwasów i zasad.

Do klasycznych metod wykrywania i oznaczania saponin należą następujące metody [4]:

- biologiczne, a zwłaszcza hemoliza erytrocytów,
- fizykochemiczne, w tym próba dotycząca zdolności pianotwórczej,
- chemiczne jak np. próby ze stężonym kwasem siarkowym, trichlorkiem antymonu, waniliną, które są podstawą do jakościowych i ilościowych oznaczeń kolorymetrycznych.

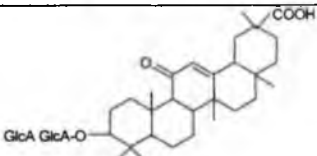
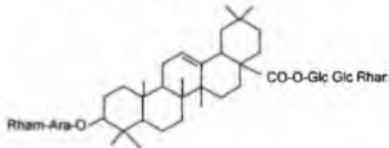
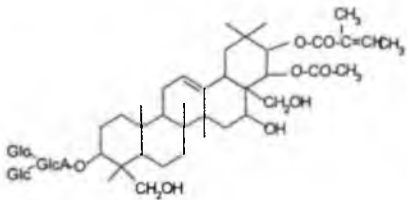
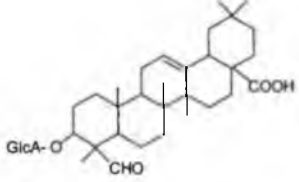
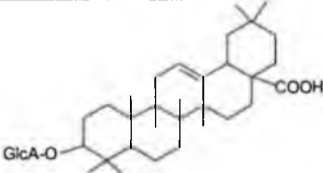
Próby z hemolizą erytrocytów są uciążliwe i obarczone błędem ze względu na różną aktywność hemolityczną poszczególnych saponin. Natomiast spektrofotometryczne metody analityczne są mało przydatne do oznaczania tej grupy związków, głównie ze względu na różną intensywność tworzenia barwnych połączeń i brak odpowiednich wzorców.

Od dawna przy oczyszczaniu i w analityce saponin znajdują zastosowanie metody chromatograficzne – szczególnie TLC i HPLC. Do rozdzielania saponin metodą HPLC stosuje się różne fazy ruchome zawierające najczęściej acetonitryl przy elucji izokracycznie i w gradiencie [1, 2].

Tabela 1

Chemiczna struktura saponin triterpenoidowych.

Chemical structures of triterpene saponins.

Saponina Saponin	Struktura / Structure	Aglikon Aglycone	Występowanie Occurrence
Glicyryzyna (Glycyrrhizic acid)		Kwas glicyretynowy (Glycyrrhetinic acid)	Lukrecja Liquorice (<i>Glycyrrhiza glabra</i>)
Hederakozyd (Hederacoside C)		Hederagenina (Hederagenin)	Bluszcz Ivy (<i>Hedera helix</i>)
Escyna (β-Escin)		Protoescygenina (Protoescigenin)	Kasztanowiec Horse-chestnut (<i>Aesculus hippocastanum</i>)
Gipsogenina (Gypsogenin-3-glucuronide)		Gipsogenina (Gypsogenin)	Łyszczec (<i>Gypsophila sp.</i>)
Saponina buraczana (Sugar beet saponin)		Kwas oleanolowy (Oleanolic acid)	Burak cukrowy Sugar beet (<i>Beta alba</i>)

Źródło: opracowanie własne wg [1,6,7]

Cel pracy

Celem pracy było porównanie jakościowego składu saponin, z wybranych źródeł, metodą chromatografii cienkowarstwowej i dobranie warunków rozdzielania niektórych saponin metodami HPLC z zastosowaniem w fazie ruchomej metanolu jako rozpuszczalnika – tańszego i mniej toksycznego od powszechnie stosowanego acetonitrylu.

Materiały i metody badań

Materiał badawczy stanowiły:

- handlowe preparaty saponin: glicyryzyna (glicyrrhizic acid – SIGMA), saponina biała (saponin white pure – MERCK), saponina czysta (Saponin rein DAB – FLUKA),
- saponiny wyodrębnione z handlowych produktów farmaceutycznych: hederyna z syropu Hedelix, escyna z żelu Aescin,
- saponiny wyodrębnione z produktów cukrowniczych: soku surowego, soku gęstego i wysłodków,
- kwas oleanolowy (oleanolic acid – SIGMA).

Wyodrębnianie saponin z produktów farmaceutycznych i cukrowniczych prowadzono przez trzykrotną ekstrakcję butanolem odpowiednich wodnych roztworów w temp. pokojowej, po czym ekstrakty butanolowe przemywano wodą i po oddestylowaniu butanolu, saponiny rozpuszczano w bezwodnym metanolu.

Roztwory metanolowe wszystkich badanych saponin (1–5 mg/ml) poddano bezpośrednio analizie TLC. Ponadto glicyryzynę, saponinę białą, saponiny z soku surowego i gęstego poddano hydrolizie w roztworze 1M HCl, w środowisku 50% MeOH, w zatopionych ampułkach, we wrzącej łaźni wodnej, w czasie 90 min oraz analogicznie z użyciem 0,5 M H₂SO₄, po czym oznaczano skład jakościowy saponin i aglikonów metodą TLC w dwóch układach rozwijających.

Chromatografię cienkowarstwową wykonano na płytkach chromatograficznych (DC – Alufolien Kieselgel 60 F254 MERC) 20x20 cm pokrytych 0,2 cm warstwą żelu krzemionkowego. Fazą ruchomą dla saponin był: octan etylu-kwas octowy-woda (7:2:2, v/v/v) dla produktów hydrolizy benzen-metanol (9:1 v/v).

Po rozwinięciu chromatogramy suszono w suszarce, spryskiwano odczynnikami aldehyd anyżowy – kwas octowy lodowaty – metanol – stężony H₂SO₄ (0.5:10:85:5, v/v/v/v) i ogrzewano w temp. 110°C przez 5 min.

Analizie HPLC poddano saponiny z trzech różnych źródeł, będące glukuronidami: glicyryzynę, saponinę białą, saponiny z buraka cukrowego.

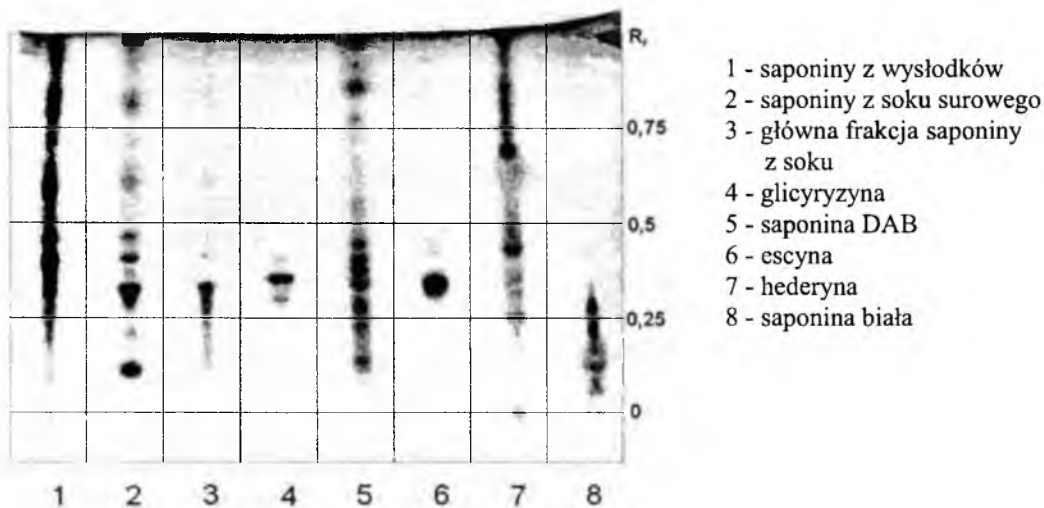
Analizę chromatograficzną prowadzono z użyciem chromatografu firmy Knauer z systemem sterowania obróbki danych EuroChrom 2000, z zastosowaniem detektora

UV o długości fali 206 nm i kolumny Lichrosorb RP-18 250×4,6 mm. Chromatografię prowadzono z szybkością przepływu 0,8 ml/min w fazie metanol-woda (75:25, v/v) oraz chromatografię w odwróconej fazie z dodatkiem TBA (wodorotlenek tetrabutylamonowy) o składzie:

- 70% metanolu 30% wody z dodatkiem 3mM/l TBA i kwasu H_3PO_4 do pH = 4,
- 75% metanolu 25% wody z dodatkiem 3mM/l TBA i kwasu H_3PO_4 do pH = 4,
- 85% metanolu 15% wody z dodatkiem 3mM/l TBA i kwasu H_3PO_4 do pH = 4.

Wyniki i dyskusja

Wyniki chromatografii cienkowarstwowej badanych saponin przedstawiono na rys. 2. i 3., a uzyskane wartości R_f saponin zawiera tab. 2. Chromatogramy TLC (rys. 2) świadczą o dużym zróżnicowaniu badanych saponin pod względem zabarwienia plam (od brązowych do różowofioletowych), co wskazuje na istotne różnice jakościowe i ilościowe. Z porównania położenia plam saponin wzorcowych na płytce (glicyryzyny, saponiny białej i escyny) i plam pozostałych saponin wynika, iż zakres R_f od 0,15 do 0,65 odpowiada grupie związków o charakterze saponin, zaś plamy o R_f od 0,65 do 0,91 odnoszą się do prosapogenin i innych substancji. W większości badane saponiny występują jako grupa kilku związków o R_f 0,15-0,65. Saponina DAB z drzewa kwilajowego (*Quillaja saponaria*) i saponiny otrzymane z wysłodków i soku surowego charakteryzują się dużym zróżnicowaniem jakościowym (rys. 2). Z rys. 2. wynika też, iż saponiny z soku jako dominujący składnik zawierają saponinę o $R_f = 0,34$ zaś saponiny z wysłodków jako główny składnik saponinę o $R_f = 0,43$.



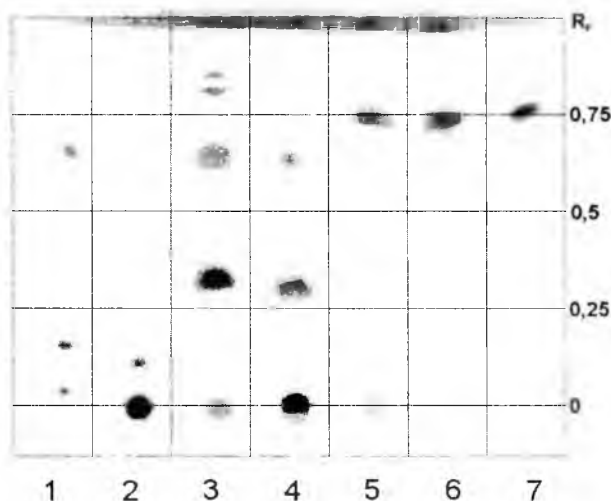
Rys. 2. Chromatogram TLC badanych saponin w układzie 1.

Fig. 2. TLC chromatogram of examined saponins in mobile phase 1.

Tabela 2

Wartości R_f dla badanych saponin i prosapogenin.
Value R_f of examined saponins and prosapogenins.

Saponina Saponins	Zakres R_f Range of R_f	R_f i barwa głównego składnika Colour of main constituent
Saponiny z wysłodków Saponins of beet pulp	0.21-0.91	0.43 ciemnofioletowy - dark-violet
Saponiny z soku Saponins of juice	0.21-0.91	0.34 fioletowy - violet
Osad z soku w metanolu Methanolic sediment from juice	0.21-0.36	0.34 fioletowy - violet
Glicyryzyna Glycyrrhizic acid	0.30-0.52	0.38 różowy - pink
Saponina DAB Saponin DAB	0.15-0.91	0.35 brunatny - brown
Escyna β -Escin	0.30-0.39	0.36 ciemnofioletowy - dark-violet
Hederyna Hederyn	0.26-0.78	0.65 brązowy - brown
Saponina biała White saponin	0.15-0.35	0.28 brązowy - brown



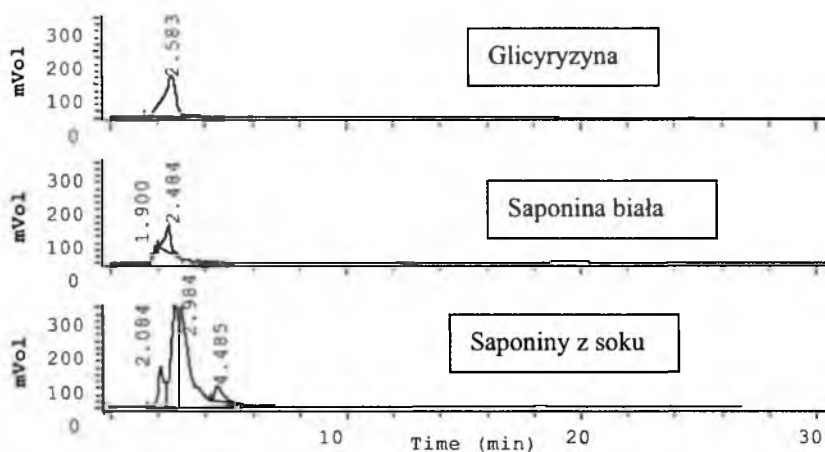
- 1 - saponina biała po hydrolizie 1M HCl, 4 - glicyryzyna po hydrolizie 0,5M H₂SO₄,
2 - saponina biała po hydrolizie 0,5M H₂SO₄, 5 - saponiny z soku gęstego po hydrolizie 1M HCl,
3 - glicyryzyna po hydrolizie 1M HCl, 6 - saponiny z soku surowego po hydrolizie 1M HCl,
7 - kwas oleanolowy.

Rys. 3. Chromatogram saponin po hydrolizie w układzie 2.

Fig. 3. TLC chromatogram of hydrolysed saponins in mobile phase 2.

Chromatogramy TLC produktów hydrolizy glicyryzyny, saponiny białej, saponiny z soku gęstego i surowego przedstawiono na rys. 3. Wszystkie saponiny poddane działaniu 1M HCl uległy wyczerpującej hydrolizie. Głównym aglikonem saponin z buraka cukrowego jest kwas oleanolowy.

Następnie podjęto próbę doboru fazy ruchomej do rozdzielania: glicyryzyny, saponiny białej, saponin buraka cukrowego (z soku surowego), z zastosowaniem techniki HPLC, z użyciem fazy metanol-woda (75:25, v/v) oraz chromatografii w odwróconej fazie. Wyniki analiz HPLC przedstawiono na rys. 4, 5, 6. Z rys. 4. wynika, że w fazie metanol-woda (75:25, v/v) glicyryzyna, saponina biała i saponiny buraka cukrowego (z soku) nie ulegają zadowalającemu rozdzielaniu na składniki.

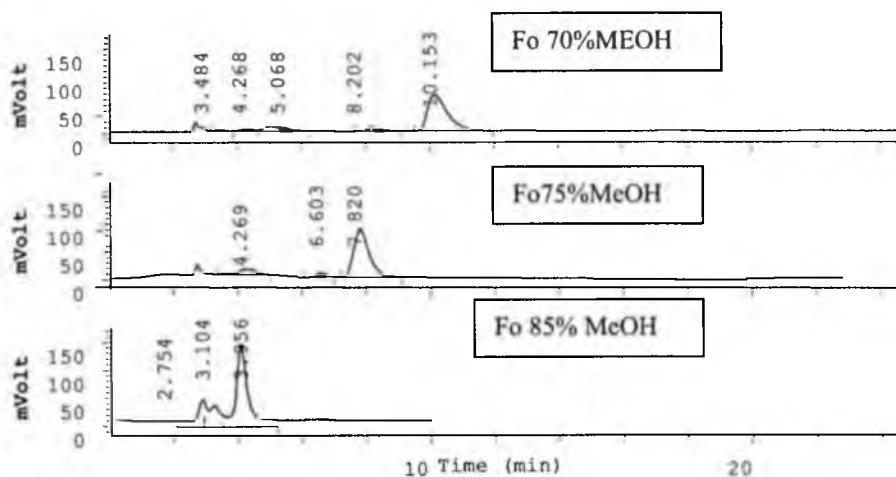


Rys. 4. Chromatogram HPLC badanych saponin w fazie metanol: woda 75:25 (liczby nad pikami podają czasy retencji).

Fig. 4. HPLC chromatogram of examined saponins in phase methanol : water 75:25 (number over pik indicates retention time).

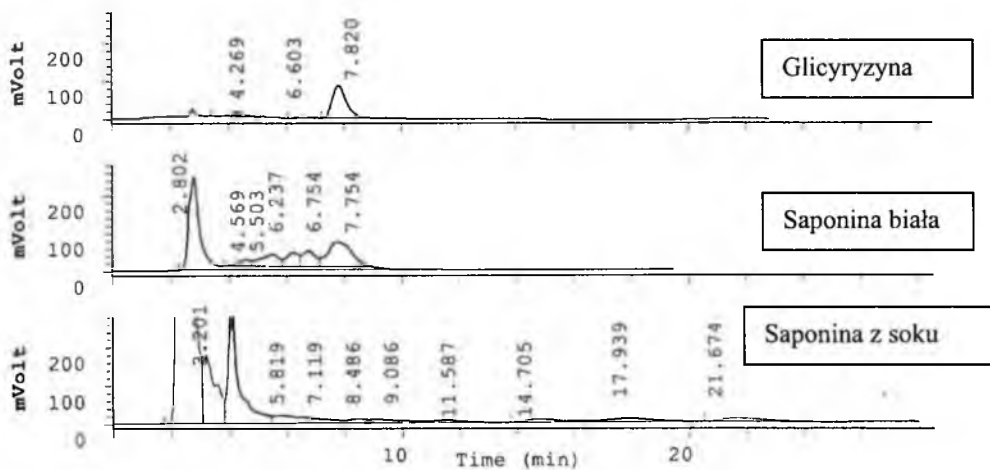
Na rys. 5. przedstawiono wyniki rozdzielania glicyryzyny w fazie z dodatkiem 3mM/l TBA i udziale metanolu odpowiednio: 70, 75, 85%. Z rys. 5. wynika, że najkorzystniejszą fazą do rozdzielania glicyryzyny jest faza o składzie 75% metanolu 25% wody, 3 mm TBA o pH 4. W tych warunkach otrzymuje się trzy ostre piki. Zmniejszenie bądź zwiększenie udziału metanolu w fazie ruchomej wpływa niekorzystnie na rozdzielanie. W przypadku chromatografii w odwróconej fazie o 70% udziale metanolu piki poprzedzające pik główny stają się rozmyte, wydłuża się też czas analizy, natomiast w przypadku chromatografii w odwróconej fazie z 85% metanolu nie następuje dokładny rozdział typu „base line”.

Na rys. 6. przedstawiono rozdzielanie trzech badanych saponin o charakterze glikuronidów w fazie ruchomej wyznaczonej dla glicyryzyny.



Rys. 5. Chromatogram HPLC glicyryzyny w fazie z TBA o różnym udziale metanolu (liczby nad pikami podają czasy retencji).

Fig. 5. HPLC chromatogram of glycyrrhizic acid in phase with TBA and different methanol content (number over pik indicates retention time).



Rys. 6. Chromatogram HPLC badanych saponin w fazie z TBA o 75% udziale metanolu (liczby nad pikami podają czasy retencji).

Fig. 6. HPLC chromatogram of examined saponins in phase with TBA and 75% methanol content (number over pik indicates retention time).

W tych warunkach rozdziela się dobrze również saponina biała, a znacznie gorzej saponiny z surowego soku z buraków. Dalsze badania wykazały, że do rozdzielenia saponin z buraka cukrowego korzystne jest stosowanie chromatografii w odwróconej fazie z 85% udziałem metanolu.

Wnioski

1. Technika TLC jest korzystna ze względu na stosunkowo prosty i zarazem niedrogi sposób analizy. Przydatna jest podczas wyodrębniania i oczyszczania saponin oraz do szybkiej oceny składu preparatów saponin.
2. Technika HPLC umożliwia analizę ilościową roztworów o niskich stężeniach saponin.
3. Do rozdzielania saponin z grupy glukuronidów metodą HPLC w odwróconej fazie niezbędne jest dostosowanie fazy ruchomej do poszczególnych saponin.

LITERATURA

- [1] M. Burnouf-Radosevich, N.E. Delfel.: High-performance liquid chromatography of triterpene saponins. *J. Chrom.*, **368**, 1986, 433.
- [2] E. Max Henry, D. Pauthe-Dayde, M. Rochd.: Extraction and high-performance liquid chromatographic determination of gypsogenin 3,O-glucuronide. *J. Chrom.*, **519**, 1990, 109.
- [3] M. Jurzysta, S. Burda, W. Oleszek, M. Płoszyński.: Studies on *Medicago lupulina* saponins. Isolation and chemical characterization of blossom saponins. *Acta Soc. Bot. Polon.*, **56**, 1987, 101.
- [4] J. Muszyński: *Farmakognozja*. PZWL, Warszawa 1957.
- [5] W. Oleszek: Solid Phase Ekstraktion.: Fractionation of alfaalfa saponins. *J. Sci. Food. Agric.*, **44**, 1988, 43.
- [6] H. Schiweck, G. Steinle, E. Fischer.: Bestimmung des Saponingehaltes in Zuckerfabrikprodukten und Verhalten Während des Prozesses. *Proceedings 19th Gen Assambley, Comm. Tech. Sucrierie*, Cambridge, 1991, 441.
- [7] O. Tanaka.: Improvement of taste of natural sweeteners. *Pure and Applied Chemistry JUPAC*, **69**, 1997, 675.

DETECTION AND DETERMINATION OF SAPONINS WITH APPLICATION OF DIFFERENT CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES

S u m m a r y

Qualitative composition of selected saponins and products of their acid hydrolysis were compared by TLC method. The conditions of separation of glycyrrhizic acid, white saponin, and sugar beet saponins by HPLC method with the use of methanol as a main solvent were elaborated.

The use of liquid chromatography TLC and HPLC makes it possible to prove the huge differentiation of composition of qualitative and quantitative composition of examined saponins. Good separation of saponins from group of glucuronides was achieved with methanol elution in phase method with addition of TBA (tetrabutylammonium hydroxide). ☒

MAŁGORZATA PIECYK

FILTRACJA ŻELOWA BIAŁEK AMORFICZNYCH I KRYSZTALICZNYCH Z NASION FASOLI PRZY UŻYCIU HPLC

Streszczenie

W pracy porównywano udział frakcji białkowych w produktach pośrednich (ekstrakcie i supernatancie) oraz produkcie końcowym (wytrącony osad białek), które otrzymywano podczas uzyskiwania preparatów białek amorficznych i krystalicznych. Preparaty białek amorficznych otrzymano za pomocą alkalicznej ekstrakcji i wytrącenie białek w punkcie izoelektrycznym. Preparaty białek krystalicznych otrzymano przez wytrącenie kryształów (5°C, 18 h) z ekstraktów kwasowych. Białka amorficzne i krystaliczne zbudowane są z dwóch głównych frakcji odpowiadających faseolinie i leguminie. Ich udział wynosił odpowiednio 64% w preparacie amorficznym i 89% w preparacie krystalicznym. Frakcja o masie cząsteczkowej 101 kDa występująca w ekstraktach białkowych w dużych ilościach (25–33%) nie była odzyskiwana w preparatach.

Wstęp

Z nasion roślin strączkowych można otrzymać preparaty wysokobiałkowe. W zależności od użytej metody izolacji uzyskuje się białka o różnej strukturze: amorficznej lub krystalicznej, i o różnych właściwościach funkcjonalnych [1, 12].

Szeroko stosowana jest procedura otrzymywania preparatów białkowych przez wytrącenie białek w punkcie izoelektrycznym (pH 4,4–4,6) z alkalicznych ekstraktów mąki [11]. Metoda ta daje białka bezpostaciowe tzw. amorficzne.

Inną metodą jest izolacja wykorzystująca zdolność tych białek do tworzenia kryształów w środowisku kwaśnym. Wśród nasion roślin strączkowych jedynie z nasion fasoli można otrzymać za pomocą prostych metod formy krystaliczne białek. Właściwość tę wykazuje faseolina, główna frakcja białek globulinowych fasoli. Glicynina, główne białko nasion soi nie tworzy kryształów. Trudność w otrzymaniu krystalicznych form białek nasion soi wynika z właściwości molekularnych, polimorfizmu

i pierwszorzędowej struktury białka [12]. Za pomocą genetycznej modyfikacji glicyniny soi otrzymano białka o strukturze krystalicznej [7].

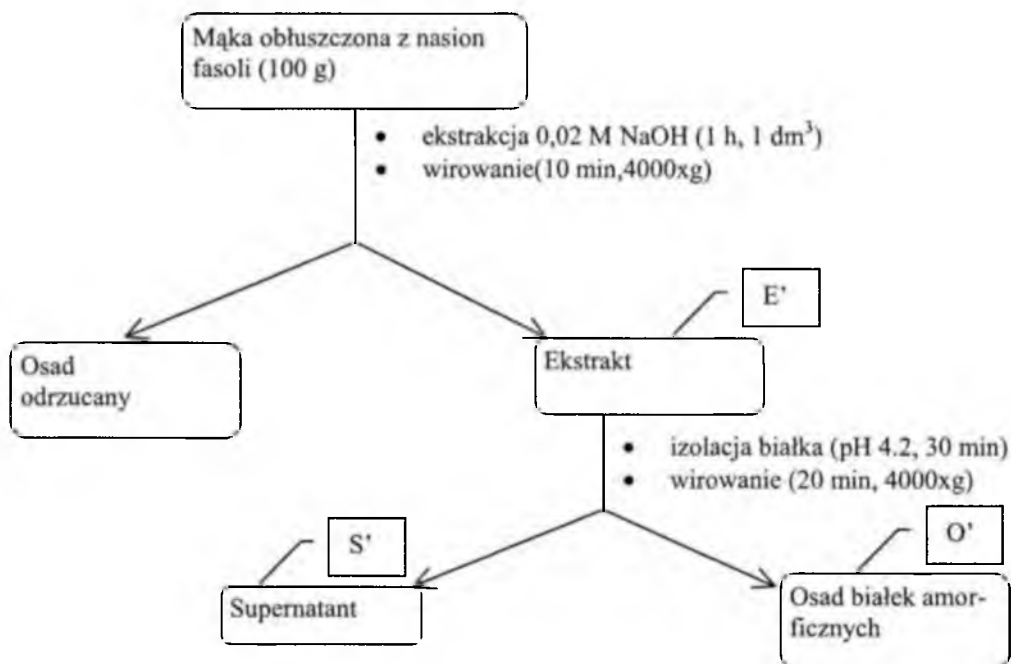
Wykazano, że białka krystaliczne i amorficzne różnią się ilością frakcji (rozdziały elektroforetyczne), strawnością, zawartością związków biologicznie czynnych oraz właściwościami funkcjonalnymi [6, 8, 9, 10].

Celem pracy było zbadanie wpływu zastosowania dwóch różnych metod do otrzymywania preparatów białkowych z nasion fasoli, na udział poszczególnych frakcji w produkcie końcowym oraz w produktach pośrednich uzyskiwanych podczas procesu technologicznego.

Material i metody badań

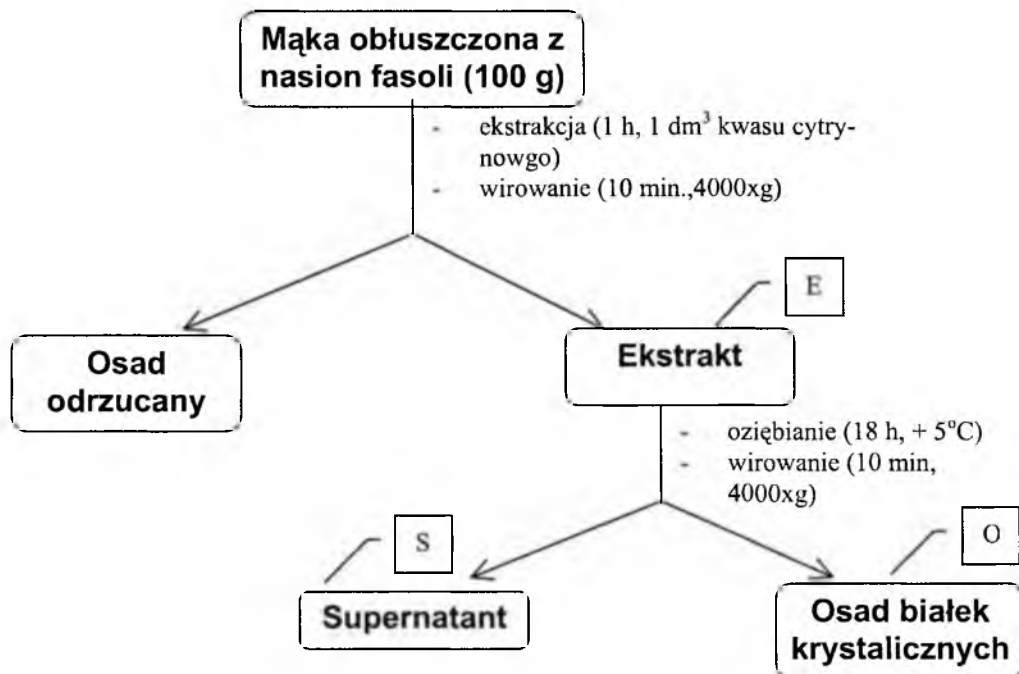
Materiał doświadczalny stanowiły nasiona fasoli białej (*Phaseolus vulgaris*) trzech odmian (Mela, Proсна, Wenta), które poddano obłuszczeniu i przemiałowi. Z mąki otrzymywano:

- preparaty białek amorficznych – przez ekstrakcję alkaliczną i wytrącenie w pH 4,2 (rys. 1),
- preparaty białek krystalicznych – przez ekstrakcję w kwasie cytrynowym (0,03 M, pH 5,5) i krystalizację przez 18 godzin w 5°C (rys. 2).



Rys. 1. Otrzymywanie białek amorficznych.

Fig. 1. Procedure for obtention of amorphous protein preparation.



Rys. 2. Otrzymywanie białek krystalicznych.

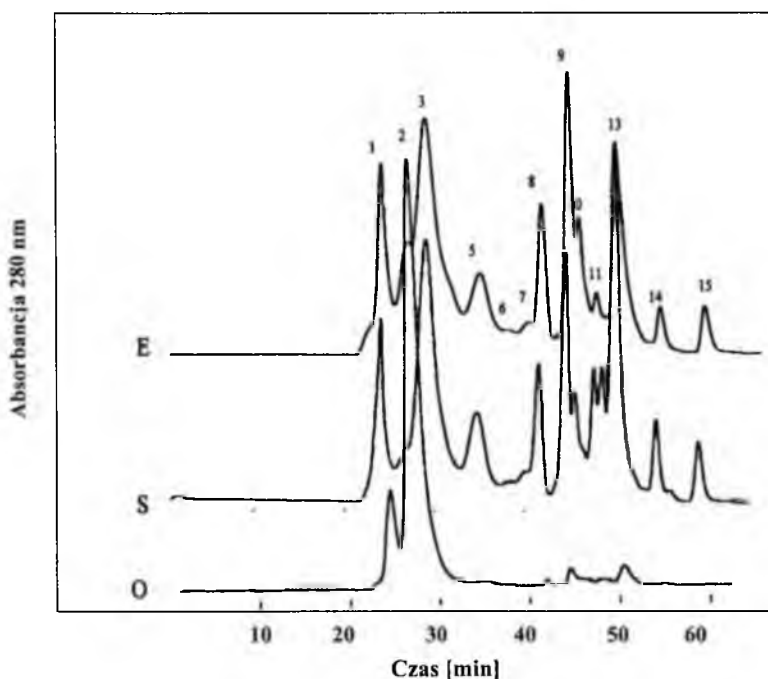
Fig. 2. Procedure for obtention of crystalline protein preparation.

Białka rozdzielano metodą HPLC na kolumnie TSK G2000SW LKB (0,75 x 60 cm). Detekcję prowadzono przy 280 nm (detektor UV SPD-6A Shimadzu). Stosowano fazę ruchomą bufor fosforanowy (0,1 M pH 7,0) i NaCl (0,5M) o przepływie 0,5 ml/min. Do integracji pików wykorzystano inegrator C-R6A Shimadzu. Do kalibracji kolumny użyto jako wzorców mas cząsteczkowych (firmy Pierce): cytochromu (12,5 kDa), chymotrypsynogenu (25 kDa), albuminy jaja (45 kDa), albuminy wołowej (67 kDa), katalazy (158 kDa), ferrytyny (240 kDa) i Blue Dekstranu (2000 kDa). W celu zidentyfikowania globuliny 7S przeprowadzono rozdział oczyszczonej faseoliny [4] otrzymanej z nasion fasoli odmiany Wenta w INRA w Nantes we Francji.

Próbki do analizy przygotowywano według schematu przedstawionego na rys. 3. i 4. Ekstrakt (E i E') i supernatant (S i S') po przesączeniu przez filtr Supelco o średnicy porów 40 μm, nanoszono na kolumnę. Natomiast osad (O i O') rozpuszczano w buforze fosforanowym (0,1M, pH 7,0) i po przesączeniu nanoszono na kolumnę 20 μl próbki.

Wyniki i dyskusja

Na rys. 3. i 4. przedstawiono chromatogramy filtracji żelowej próbek ekstraktu, supernatantu i osadu, które otrzymywano podczas alkalicznej i kwasowej izolacji białka z fasoli odmiany Mela. Kalibracja kolumny wykazała, że nie można wyznaczyć mas cząsteczkowych pików 1 i 2. Na podstawie rozdziału oczyszczonej fazeoliny pik 2. zidentyfikowano jako globulinę 7S (150–180 kDa). Natomiast pik 1. zidentyfikowano jako globulinę 11 S (310–400 kDa) na podstawie danych literaturowych [3, 5] i biorąc po uwagę udział procentowy tej frakcji białkowej. Masy cząsteczkowe pozostałych frakcji białkowych obliczano z krzywej wzorcowej wykreślonej na podstawie czasów retencji wzorców [2].



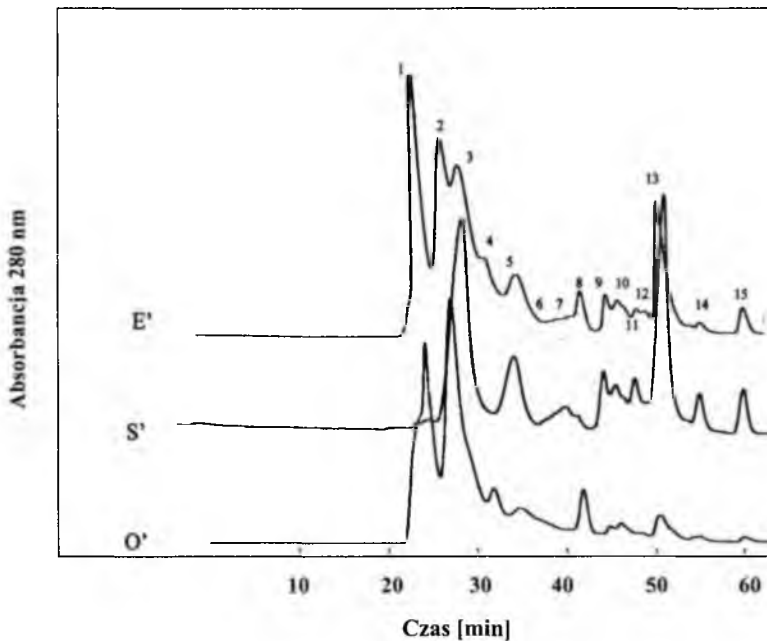
Rys. 3. Chromatogram filtracji żelowej białek ekstraktu (E), supernatantu (S) i osadu (O) otrzymywanych podczas krystalizacji białek z fasoli odmiany Mela.

Fig. 3. Chromatograms of gel filtration of extracts (E), supernatants (S), and protein precipitates (O) obtained by acid extraction from beans var. Mela.

Na podstawie uzyskanych wyników udziałów procentowych rozdzielonych frakcji (tab. 1) zaobserwowano, że alkaliczny ekstrakt białek zawierał trzy dominujące frakcje – 7S i 11S i frakcją o masie cząsteczkowej 101 kDa, które stanowiły około 50–60% wszystkich białek. W ekstrakcie białek krystalicznych dominowała frakcja o ma-

się cząsteczkowej 101 kDa, która stanowiła około 25%. Frakcje 7 S i 11S występowały w mniejszych ilościach (18%).

Supernatant otrzymany po wytrąceniu białek w punkcie izoelektrycznym zawierał trzy dominujące frakcje 101; 32,5 i 10,3 kDa, które stanowiły około 60% wszystkich białek. Te same frakcje obecne były w supernatantach otrzymanych po wytrąceniu kryształów białek z roztworów kwasu cytrynowego, ale w mniejszych ilościach (około 48%).



Rys. 4. Chromatogram filtracji żelowej białek ekstraktu (E'), supernatantu (S') i osadu (O') otrzymanych podczas izolacji alkalicznej białek z fasoli odmiany Mela.

Fig. 4. Chromatograms of gel filtration of extracts (E'), supernatants (S'), and protein precipitates (O') obtained by alkaline extraction from beans var. Mela.

W białkach amorficznych dominowała frakcja 7 S, która stanowiła około 40-50% wszystkich białek. W mniejszej ilości obecna była frakcja 11S (ok. 14%). Porównując białka amorficzne z ekstraktem zaobserwowano zwiększenie się udziału frakcji niskocząsteczkowych (w zakresie 11,5–21,5 kDa) z 14% do 35% w białku amorficznym oraz brak frakcji o masie cząsteczkowej 101 kDa.

W białkach krystalicznych dominowała również frakcja o masie cząsteczkowej 7S, ale jej udział był większy niż w białkach amorficznych i stanowił 78%. Frakcja 11S stanowiła 11%. W porównaniu z białkami amorficznymi mniej było frakcji niskocząsteczkowych (około 10%).

Tabela 1

Udział frakcji białkowych (jako procent całkowitej ilości białka rozdzielanego) w ekstrakcie, supernatancie i osadzie otrzymanych z fasoli odmiany Mela.

Proportion of each fraction (As percent of total protein fractionated) in extracts, precipitates and supernatants obtained from beans var. Mela.

Nr frakcji Fraction no.	Masa cząsteczkowa MW kDa	Białka krystaliczne Crystalline protein			Białka amorficzne Amorphous protein		
		Ekstrakt Extract	Supernatant	Osad Precipitate	Ekstrakt Extract	Supernatant	Osad Precipitate
1		10	7,5	12	21	0,5	14
2		8	nw*	77	18	1,5	41
3	101	27,5	29,5	nw	26,5**	34	nw
4	54	nw	nw	nw		nw	nw
5	32,5	8,5	8,5	0,5	8,5	12	5
6	21	1	1	nw	2	nw	7
7	18	2	2	nw	1	5,5	nw
8	16,2	7	6	nw	2,5		5,5
9	13,6	14,5	9	3,5	2	4,5	17
10	12,3		5		3	5,5	
11	11,5	3	4	1	1	5	nw
12	11		3,5		1,5	nw	4,5
13	10,3	14,5	18,5	5	10,5	24,5	5
14	8,7	2	3	nw	1	3,5	1
15	7,6	2	2,5	1	1,5	3,5	nw

* nie wykryto / non detected

** piki nierozdzielone / non-separated peaks.

Wnioski

1. Białka krystaliczne w 89 % zbudowane są z frakcji 7S i 11S.
2. Białka amorficzne zbudowane są również z faseoliny i leguminy, ale ich udział jest mniejszy (64%), więcej jest frakcji o niskich masach cząsteczkowych.
3. Frakcja o masie cząsteczkowej 101 kDa występująca w dużej ilości w ekstrakcie białek krystalicznych (około 25-30%) nie jest obecna w preparacie białkowym.

LITERATURA

- [1] Alli I., Baker B.E.: Constitution of Leguminous Seeds: The Microscopic Structure of Proteins Isolated from *Phaseolus* Beans, *J. Sci. Food Agric.*, **31**, 1980, 1316.
- [2] Andrews P.: Estimation of molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration, *Biochem. J.*, **99**, 1964, 222.

- [3] Carbonaro M., Capelloni M., Nicoli S., Lucarini M., Carnovale E.: Solubility - Digestibility Relationship of Legume Proteins, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 3387.
- [4] Chang K.C., Satterlee L.D.: Isolation and characterisation of the major protein from great northern beans (*Phaseolus vulgaris*), *J. Food Sci.*, **46**, 1981, 1368.
- [5] Derbyshire E., Wright D.J., Boulter D.: Legumin and Vicilin, Storage Proteins of Legume Seeds. *Phytochemistry*, **15**, 1976, 3.
- [6] DiLollo A., Alli I., Biliarderis C., Barthakur N.: Thermal and Surface Active Properties of Citric Acid-Extracted and Alkali-Extracted Proteins from *Phaseolus* Beans, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1993, 24.
- [7] Gidamis A.B., Mikami B., Katsube T., Utsumi S., Kito M.: Crystallization and Preliminary X-Ray Analysis of Soybean Proglycinins Modified by Protein Engineering, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**, 1994, 703.
- [8] Li Z., Alli I., Kermasha S.: Tryptic Hydrolysis (in Vitro) of Crystalline and Noncrystalline Proteins from *Phaseolus* beans, *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1989, 643.
- [9] Piecyk M., Mitek A.: Wpływ procesu krystalizacji białek z nasion fasoli na zawartość niektórych związków biologicznie czynnych. Materiały XXX Sesji KTChZ PAN, Kraków 1999.
- [10] Piecyk M., Worobiej E., Klepacka M.: In vitro digestibility of crystalline proteins from beans (*Phaseolus vulgaris*), *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **2**, 2000, 29.
- [11] Sosulski F. W., McCurdy A.R.: Functionality of flours, protein fractions and isolates from Field peas and Faba bean, *J. Food Sci.*, **52**, 1987, 1010.
- [12] Utsumi S., Gidamis A.B., Kanamori J., Kang I.-J., Kito M.: Effects of Deletion of Disulfide Bonds by Protein Engineering on the Conformation and Functional Properties of Soybean Proglycinin, *J. Agric. Food Chem.*, **41**, 1993, 687.

FRACTIONATION BY GEL FILTRATION HPLC OF CRYSTALLINE AND AMORPHOUS PROTEINS FROM *PHASEOLUS* BEANS

S u m m a r y

The fractions of crystalline and amorphous protein preparations from *Phaseolus* beans were compared. The crystalline proteins were obtained by precipitating the crystals (5°C, 18 h) from acid extracts. The amorphous forms were obtained by isoelectric precipitation of proteins from alkaline extracts. Protein precipitates, supernatants and extracts were fractionated by gel filtration HPLC. Crystalline and amorphous proteins contained two main fractions corresponding to phaseolin and legumin. These fractions represented approximately 64% (amorphous forms) and 89% (crystalline forms) of the total proteins fractionated. The fraction (average MW = 101 kDa) was present in protein extracts in large amount (20–33%) was not recovered in precipitates proteins. ☒

ELWIRA WOROBIJ

ZMIANY WIELKOŚCI MAS CZĄSTECZKOWYCH BIAŁEK PREPARATÓW Z NASION ROŚLIN STRĄCZKOWYCH POD WPLYWEM RODNIKÓW HYDROKSYLOWYCH

Streszczenie

W pracy określano zmiany zachodzące w białkach preparatów nasion bobu, grochu i fasoli poddanych działaniu rodników hydroksylowych. Rozdziały przeprowadzone metodą SE-HPLC wykazały, że białka badanych gatunków nasion roślin strączkowych zachowują się odmiennie pod wpływem tych rodników. W białkach preparatów bobu i grochu $\cdot\text{OH}$ spowodowały przyrost frakcji wysokocząsteczkowej (330-400 kDa), wynikający z rozkładu i polimeryzacji podjednostek niskocząsteczkowych. Natomiast główna frakcja białek fasoli (7S) ulegała częściowej fragmentacji pod wpływem $\cdot\text{OH}$.

Wstęp

Wolne rodniki (np. $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$) oraz inne aktywne formy tlenu ($^1\text{O}_2$, H_2O_2) wywołują szereg niekorzystnych zmian w żywności, przyczyniają się do pogorszenia jej jakości żywieniowej i sensorycznej.

W przemyśle spożywczym procesom utleniania zapobiega się powszechnie przez stosowanie przeciwutleniaczy. Dużą wagę przywiązuje się ostatnio do przeciwutleniających właściwości białek [7, 8, 12]. Badania przeprowadzone na białkach nasion roślin strączkowych wykazały ich wysoką aktywność antyrodnikową [1, 3, 4, 9].

Należy jednak również zwrócić uwagę na fakt, że białka biorąc udział w zmiataniu wolnych rodników same ulegają zmianom – następuje fragmentacja i tworzenie polimerów [6, 7], zostaje też obniżona ich strawność [10]. Produkty powstałe pod wpływem rodników nie są wykorzystywane przy syntezie białka [11].

Celem pracy było określenie zmian zachodzących w białkach preparatów otrzymanych z nasion bobu, grochu i fasoli pod wpływem działania rodników hydroksylo- wych.

Materiał i metody badań

Materiał doświadczalny stanowiły obłuszczone i zmielone nasiona bobu odmiany *Bartom*, grochu odmiany *Poa*, fasoli białej odmian *Piękny Jaś Tyczny* i *Prosna* oraz fasoli kolorowej: brązowej odmiany *Nida*, czarnej odmiany *Green Mung* i czerwonej odmiany *Red Kidney*.

Badania prowadzono na preparatach białkowych otrzymanych w procesie izolacji w punkcie izoelektrycznym z alkalicznych ekstraktów mąki. Oczyszczoną globulinę 7S z nasion fasoli uzyskano we Francji w Laboratorium Technologii i Biochemii Białek (INRA, Nantes).

Preparaty białkowe [5 mg białka/ml] inkubowano w 37°C przez 24 godz., w mieszaninie generującej wolne rodniki hydroksylo- we, zawierającej H_2O_2/Cu^{2+} w buforze fosforanowym o pH 7,2. Próbką odniesienia były preparaty nie poddane działaniu rodników hydroksylo- wych.

Do określenia zmian wielkości mas cząsteczkowych białek preparatów pod wpływem rodników hydroksylo- wych stosowano metodę SE-HPLC. Rozdziały białek wykonywano na kolumnie TSK G2000SW LKB (0,75 x 60 cm), a ich detekcję prowadzono przy 280 nm (detektor UV SPD-6A Shimadzu). Do elucji używano bufor fosforanowy (0,1 M; pH 7,0) i NaCl (0,5M) o przepływie 0,5 ml/min. Na kolumnę nanoszono 20 μ l przesączonej (filtr Supelco) próbki. Do kalibracji kolumny wykorzystano wzorce mas cząsteczkowych (firmy Pierce): cytochrom (12.5 kDa), chymotrypsynogen (25 kDa), albuminę jaja (45 kDa), albuminę wołową (67 kDa), katalazę (158 kDa), ferrytynę (240 kDa) i Blue Dekstran (2000 kDa).

Omówienie wyników

Masy cząsteczkowe frakcji białkowych obliczano stosując równanie Andrews'a [2]. Kalibracja kolumny wykazała, że nie można wyznaczyć mas cząsteczkowych dwóch pików o najkrótszych czasach retencji. W oparciu o dane literaturowe [5] pierwszą frakcję zidentyfikowano jako globulinę 11S o m. cz. 330-400 kDa. Natomiast drugi pik zidentyfikowano jako globulinę 7S (150-180 kDa) na podstawie rozdziałów oczyszczonego preparatu tej frakcji.

Analizując udziały procentowe frakcji białek zamieszczone w tab. 1. oraz chromatogramy preparatów bobu i grochu (rys. 1A, 1B) stwierdzono, że oddziaływanie rodników hydroksylo- wych spowodowało rozkład i polimeryzację frakcji niskoczą-

steczkowych o m. cz. 13–16 kDa oraz znaczny wzrost udziału frakcji o m.cz. 330–400 kDa.

Tabela 1

Udział procentowy frakcji białek preparatów bobu, grochu i fasoli oraz 7S globuliny po inkubacji (37°C/24 godz.) bez rodników i z rodnikami hydroksylowymi.

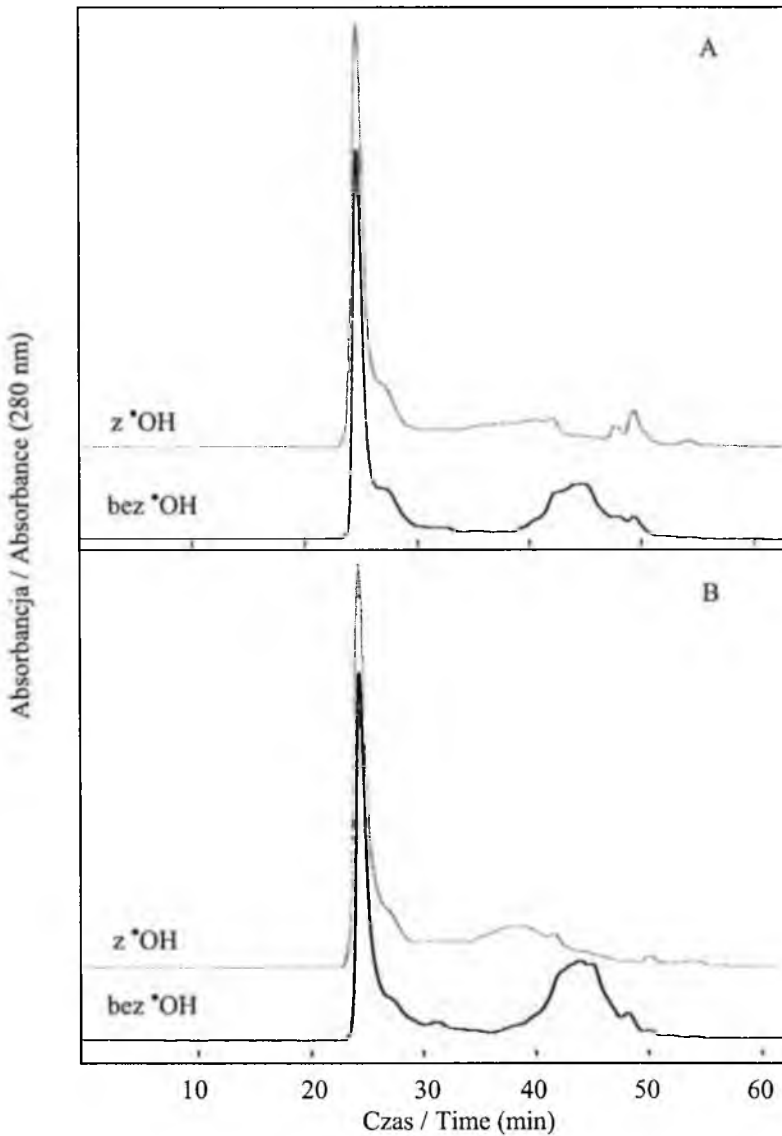
Fraction contents [%] of faba bean, pea and beans proteins preparations and 7S globulin after incubation (37°C/24 h) with and without hydroxyl radicals.

Masa cząsteczkowa Molecular mass [kDa]	Bób Faba bean		Groch Pea		Fasola / Bean				7S globulina 7S globulin	
					Nida		Jaś Tyczny			
	bez *OH	z *OH	bez *OH	z *OH	bez *OH	z *OH	bez *OH	z *OH	bez *OH	z *OH
330-400	53,5	94	53,5	78,5	8	8,5	8	11	10	16
150-180	-	-	-	-	41	36	22,5	23	90	81
52	-	-	-	-	-	-	4,5	6,5	-	-
33,5	-	-	-	-	6,5	4	5	5,5	-	-
21,5	-	-	-	16,5	2	2,5	-	44,5	-	-
16	38,5*	-	43,5		-	31,5	50,5		-	-
13,2		-		5	-			-	-	-
12,5	-	-	-	-	15	-	-	-	-	-
11,3	4	-	3	-	9,5	2,5	-	-	-	-
10,4	4	6	-	-	6	13	3	9,5	-	-
9,5	-	-	-	-	7	-	2,5	-	-	-
8,3	-	-	-	-	5	2	4	-	-	-

* - piki nie rozdzielone / non-separated peaks.

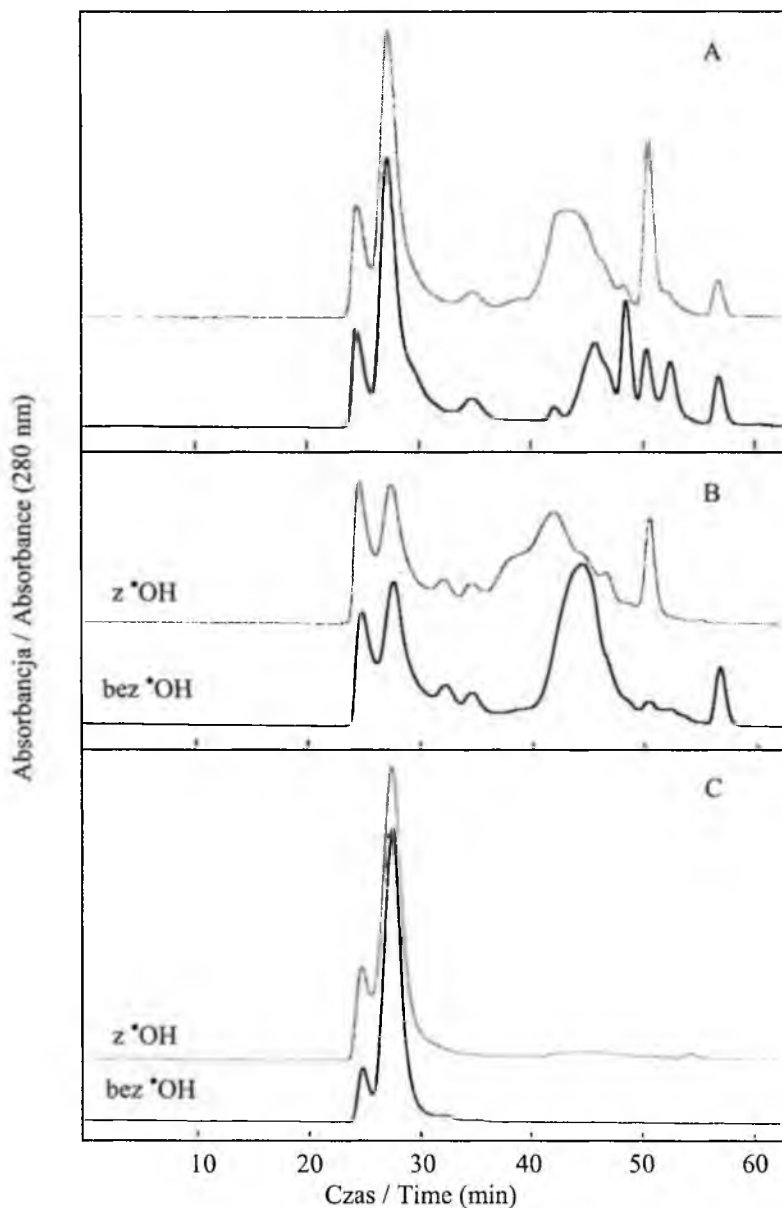
Rozdziły białek czterech spośród pięciu badanych odmian fasoli były bardzo podobne, dlatego przykładowo przedstawiono chromatogram białek fasoli brązowej odmiany *Nida* (rys. 2A). W białkach preparatów fasoli dominowała frakcja 7S, która stanowiła ok. 41% wszystkich białek. Powierzchnia tej frakcji pod wpływem *OH nie zmieniła się znacząco. Stwierdzono, że jej udział obniżył się o ok. 12%. Wyraźniejsze zmiany zaobserwowano we frakcjach niskocząsteczkowych, w miejscu pięciu frakcji o masach od 8 do 12,5 kDa zaobserwowano frakcję o m. cz. 13-16 kDa stanowiącą ok. 32%. Następował również przyrost ilościowy frakcji o m. cz. ok. 10 kDa.

Na rys. 2B przedstawiono chromatogram rozdziłu białek fasoli odm. *Jaś Tyczny*, którego przebieg wyraźnie różnił się w porównaniu z pozostałymi odmianami. W białkach tej fasoli dominowała frakcja o m. cz. ok. 16 kDa, która pod wpływem *OH ulegała fragmentacji i polimeryzacji do podjednostek o nieco wyższej masie cząsteczkowej.



Rys. 1. Chromatogramy rozdzielania białek preparatów bobu (A) i grochu (B) inkubowanych ($37^{\circ}\text{C}/24$ godz.) bez rodników i z rodnikami hydroksylowymi.

Fig. 1. Chromatograms of protein preparations from faba bean (A) and pea (B) incubated ($37^{\circ}\text{C}/24$ h) with and without hydroxyl radicals.



Rys. 2. Chromatogramy rozdziálu białek preparatów fasoli odmian *Nida* (A) i *Jaś Tyczny* (B) oraz falkcji 7S (C) inkubowanych (37°C/24 godz.) bez rodników i z rodnikami hydroksylowymi.

Fig. 2. Chromatograms of protein preparations from beans var. *Nida* (A) and *Jaś Tyczny* (B) and of 7S fraction (C) incubated (37°C/24 h) with and without hydroxyl radicals.

Białka fasoli składają się z kilku podjednostek. Aby stwierdzić jakim zmianom pod wpływem $\cdot\text{OH}$ ulegała główna frakcja, badania przeprowadzono również na oczyszczonej do 90% globulinie 7S otrzymanej z nasion fasoli (rys. 2C). Efektem działania rodników było powiększenie się obecnej również w preparacie frakcji wysokocząsteczkowej (330–400 kDa) i powstanie podjednostek niskocząsteczkowych (13–16 kDa), wynikające ze zmniejszenia udziału głównej frakcji o ok. 10%. Dane otrzymane z rozdziałów 7S globuliny potwierdzają wyniki otrzymane dla czterech odmian fasoli.

Białka badanych gatunków nasion roślin strączkowych zachowywały się odmiennie pod wpływem działania rodników hydroksylowych, co wynika z różnic w składzie ich podstawowych frakcji.

Wnioski

1. W białkach bobu i grochu, pod wpływem rodników hydroksylowych, następuje znaczący wzrost udziału frakcji wysokocząsteczkowej, świadczący o polimeryzacji białek.
2. Mniejsze zmiany pod wpływem rodników zachodziły w białkach fasoli i dotyczyły głównie podjednostek niskocząsteczkowych, natomiast udział frakcji globulin 7S zmieniał się nieznacznie.

LITERATURA

- [1] Alaiz M., Zamora R., Hidalgo, F.J. Addition of oxidized lipid/amino acid reaction products delays the peroxidation initiated in a soybean oil. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 2698.
- [2] Andrews P., Estimation of molecular weights of proteins by Sephadex gel-filtration, *Biochem. J.*, **94**, 1964, 222.
- [3] Chen H-M., Muramoto K., Yamauchi F.: Structural analysis of antioxydative peptides from soybean beta-conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 574.
- [4] Chen H-M., Muramoto K., Yamauchi F., Fujimoto K., Nokihara K.: Antioxydative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1998, 49.
- [5] Derbyshire E., Wright D. J., Boulter D.: Legumin and Vicilin, Storage Proteins of Legume Seeds. *Phytochemistry*, **15**, 1976, 3.
- [6] Gardner H. W.: Lipid Hydroperoxide Reactivity with Proteins and Amino Acids: A Review. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 1979, 220.
- [7] Hunt J.V., Simpson J.A., Dean R.T.: Hydroperoxide-mediated Fragmentation of Proteins. *Biochem. J.*, **250**, 1988, 87.
- [8] Kanazawa K., Ashida H., Nataka M.: Autoxidizing process interaction of linoleic acid with casein. *J. Food Sci.*, **52**, 1987, 475.

- [9] Okada, Y., Okada, M. Scavenging effect of water soluble proteins in broad beans of free radicals and active oxygen species. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 401.
- [10] Sanchez-Vioque R., Vioque J., Clemente A., Pedroche J., Bautista J., Millan F.: Interaction of chickpea (*Cicer arietinum L.*) legumin with oxidized linoleic acid. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1999, 813.
- [11] Simat T.J., Steinhard H.: Oxidation of free tryptophan and tryptophan residues in peptides. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 490.
- [12] Yamamoto Y., Kato E., Ando A.: Increased antioxidative activity of ovalbumin by heat treating in an emulsion of linoleic acid. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**, 1996, 1430.

CHANGES IN MOLECULAR MASS OF LEGUME PROTEIN PREPARATIONS CAUSED BY HYDROXYL RADICALS

S u m m a r y

Changes induced in protein preparations from pea, bean and faba bean by hydroxyl radicals were determined in this study. Size exclusion chromatography showed that the proteins of legumes investigated are subjected to different changes. In pea and faba bean proteins the radicals caused the increment of high molecular weight fraction (330–400 kDa) of resulted from fragmentation and polymerisation of low molecular weight subunits and, on the contrary, the main fraction of bean proteins (7S) undergoes partial fragmentation. ☒

RAFAŁ WOŁOSIAK

ZMIANY AKTYWNOŚCI PRZECIWUTLENIAJĄCEJ ALBUMIN GROCHU I FASOLI POD WPLYWEM KWASU ASKORBINOWEGO

Streszczenie

W pracy badano wpływ kwasu askorbinowego na właściwości przeciwutleniające preparatów albuminowych w emulsjach i wobec roztworów kwasu linolowego, a także ich zdolność do zmiatania stabilnych rodników DPPH*. Wykazano dużą aktywność albumin w większości stosowanych układów modelowych. Dodatek kwasu askorbinowego powodował najlepsze efekty w układach emulsyjnych, spadek zawartości nadtlenków w roztworach kwasu linolowego oraz największe zmiany aktywności przeciwrodnikowej w przypadku białek o najłagodniejszych właściwościach.

Wstęp

Od dawna znany jest niekorzystny wpływ reakcji utleniania na właściwości zdrowotne i przechowalnicze żywności, stąd też podjęto wiele prac, w których poszukuje się przeciwutleniaczy o dużej aktywności. Substancje takie mogą mieć bardzo różny mechanizm działania i w związku z tym są różnie klasyfikowane. Jeden ze sposobów to podział na przeciwutleniacze pierwszorzędowe (zapobiegające powstawaniu rodników tlenowych – głównie enzymy), drugorzędowe (zapobiegające rozwinięciu się rodnikowych reakcji łańcuchowych) i trzeciorzędowe (znoszące uszkodzenia spowodowane utlenianiem). Z punktu widzenia technologii żywności najistotniejsze są substancje należące do drugiej grupy [6]. Należą do nich m.in. α -tokoferol, kwas askorbinowy i białka. Ich działanie było wielokrotnie dowiedzione w różnych układach modelowych. Wiadomo ponadto, że łączenie przeciwutleniaczy często powoduje efekt synergistyczny. Stwierdzono m.in. współdziałanie białek z przeciwutleniaczami fenolowymi [4, 5, 9]. W innych pracach dowiedziono zwiększenia stabilności katechin w obecności kwasu askorbinowego [3], co może mieć istotny wpływ na ich właściwości antyoksydacyjne. Znany jest także pozytywny wpływ dodatku kwasu askorbinowego

na zmniejszenie ilości wolnych rodników powstających podczas interakcji białek z utleniającymi się lipidami [8]. Brak jest jednak doniesień na temat współdziałania kwasu askorbinowego i białek roślin strączkowych w reakcjach antyoksydacyjnych.

Dlatego celem niniejszej pracy było zbadanie właściwości przeciwutleniających albumin wybranych roślin strączkowych (potencjalnych, naturalnych antyoksydantów drugorzędowych) i wpływu, jaki na nie wywiera dodatek kwasu askorbinowego.

Material i metody badań

Materiałem badawczym były liofilizowane albuminy z nasion fasoli białej (AFB), fasoli brązowej (AFBr) i grochu (AG) uzyskane na drodze dializy wobec wody dejonizowanej (72 h, zatrzymywane białka o masie powyżej 12 kDa) alkalicznych ekstraktów mąki z obłuszczonych nasion. Ponadto do badań zastosowano kwas askorbinowy (Sigma A-5960) i butylohydroksytoluen (Sigma B-1378). Oznaczenia próbek stosowanych w pracy jako przeciwutleniacze przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1

Oznaczenia próbek zastosowane w pracy.

Sample codes used in the study.

Rodzaj próbki / Sample	Oznaczenie / Code
Albuminy z nasion fasoli białej (white bean albumins)	AFB
Albuminy z nasion fasoli brązowej (brown bean albumins)	AFBr
Albuminy z nasion grochu (pea albumins)	AG
Kwas askorbinowy (ascorbic acid)	KA
Albuminy z nasion fasoli białej połączone z kwasem askorbinowym	AFB+KA
Albuminy z nasion fasoli brązowej połączone z kwasem askorbinowym	AFBr+KA
Albuminy z nasion grochu połączone z kwasem askorbinowym	AG+KA
Butylohydroksytoluen (butylhydroxytoluene)	BHT
Próba odniesienia - bez dodatku przeciwutleniaczy (control sample)	PO

Określenie właściwości przeciwutleniających prowadzono w trzech różnych układach:

- 1) dodając preparaty (66 mg%) w 0,1 M buforze fosforanowym (pH 7,0) do roztworu kwasu linolowego, który poddawano procesowi utleniania w 60°C i w regularnych odstępach czasu oznaczano zawartość nadtlenków spektrofotometryczną metodą z tiocyjanianem żelaza przy $\lambda = 500$ nm [1];
- 2) stosując badane preparaty (100 mg%) jako antyoksydanty w emulsjach złożonych z kwasu linolowego, Tween 20 i 0,1 M buforu fosforanowego, w których oznaczano:

- zawartość nadtlenków (LOOH) powstających podczas utleniania emulsji (pH 7,0), w temp. 37°C przez 10 min, przy zastosowaniu hemoglobiny jako katalizatora [7],
 - zawartość produktów rozpadu nadtlenków kwasu linolowego reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS), po 24. godzinnej inkubacji emulsji (pH 7,4), w temp. 37°C, przyspieszając proces przez dodatek jonów żelaza (II) [10];
- 3) badając zmiatanie przez preparaty (100 mg%) stabilnych rodników difenylpikrylo-hydrazylowych (DPPH^{*}), poprzez rejestrację absorbancji przy 517 nm w regularnych odstępach czasu do osiągnięcia stałej wartości [2].

Uzyskane odczyty absorbancji posłużyły do obliczenia aktywności antyoksydacyjnej preparatów według wzoru:

$$Aa = (1 - A_{pw}/A_{po}) \times 100\%,$$

gdzie: A_{pw} i A_{po} – absorbancja odpowiednio dla próby właściwej i odniesienia.

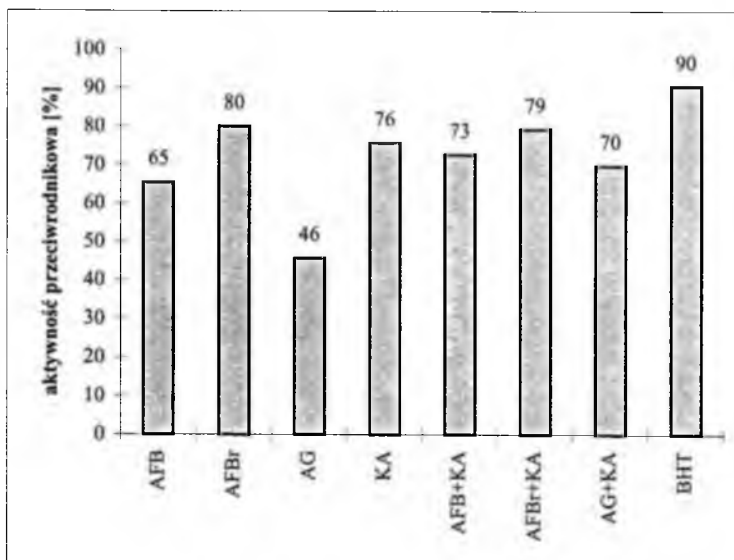
Wyniki i ich omówienie

Badając zmiatanie stabilnych rodników, rejestrowano zmiany absorbancji DPPH^{*} po dodaniu preparatów do osiągnięcia fazy plateau. Najwyższą aktywność w inaktywacji rodników wykazywał AFBr, przewyższając pod tym względem kwas askorbinowy i niewiele tylko ustępując BHT (rys. 1.). Najślabiej działały białka grochu. Połączenie AFBr z KA nie zmieniło aktywności przeciwrodnikowej tego preparatu, a wzrost zdolności do zmiatania DPPH^{*} w przypadku AFB i AG był wyraźny, ale nie przekroczył wartości obserwowanej dla kwasu askorbinowego.

Wszystkie trzy preparaty albumin wykazywały dużą aktywność w hamowaniu reakcji tworzenia nadtlenków w roztworach kwasu linolowego, przez cały okres doświadczenia (rys. 2.): zawartość nadtlenków wahała się wokół wartości początkowej w próbkach z dodatkiem albumin z obu odmian fasoli i nieznacznie wzrosła w przypadku albumin uzyskanych z nasion grochu. Najniższe zawartości nadtlenków spośród wyżej wymienionych odnotowano w próbce z dodatkiem AFBr. Wartości te były porównywalne z uzyskanymi po dodaniu BHT i niewiele wyższe od oznaczonych w próbce zawierającej kwas askorbinowy (rys. 3.).

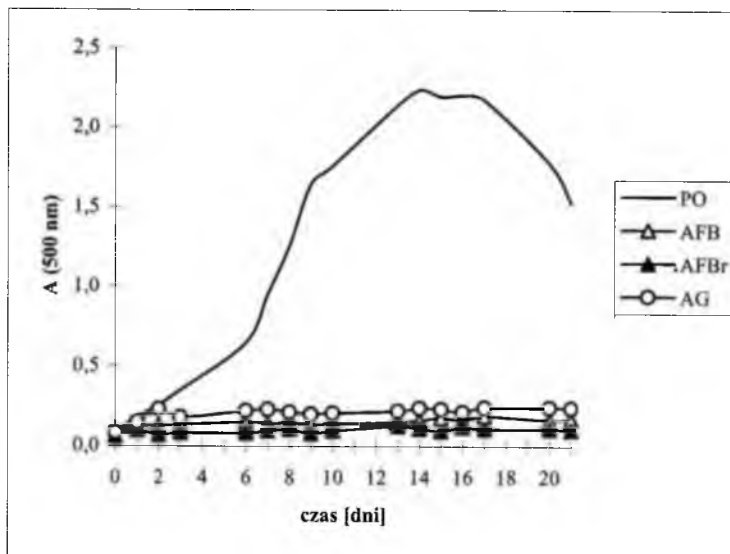
Połączenie albumin fasoli brązowej i grochu z kwasem askorbinowym spowodowało zbliżenie zawartości nadtlenków do wartości odpowiadającej samemu KA (wykazującemu przez prawie cały okres doświadczenia stuprocentową inhibicję tworzenia nadtlenków), natomiast użycie w tym celu albumin fasoli białej spowodowało znaczne pogorszenie właściwości przeciwutleniających (rys. 4.), co jest wynikiem zaskakują-

cym w kontekście zwiększenia zdolności do zmiatania rodników DPPH[•] przy takiej kombinacji antyoksydantów.



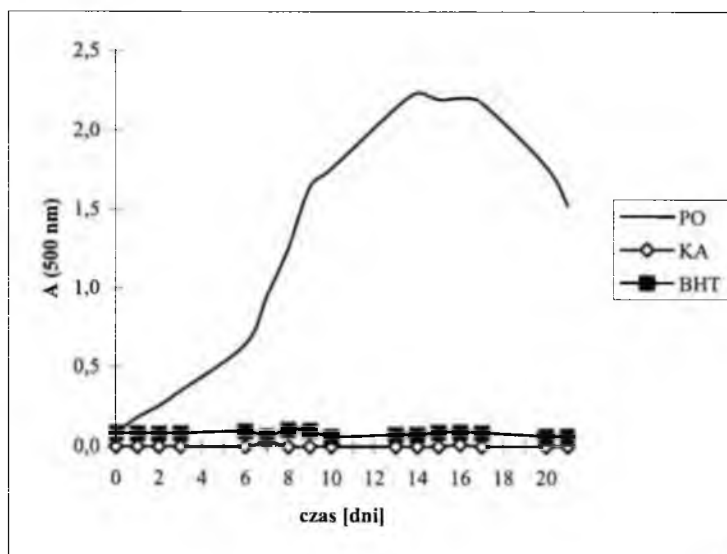
Rys. 1. Zmiatanie stabilnych rodników DPPH[•] przez preparaty.

Fig. 1. DPPH[•] stable radical scavenging activity of the preparations.



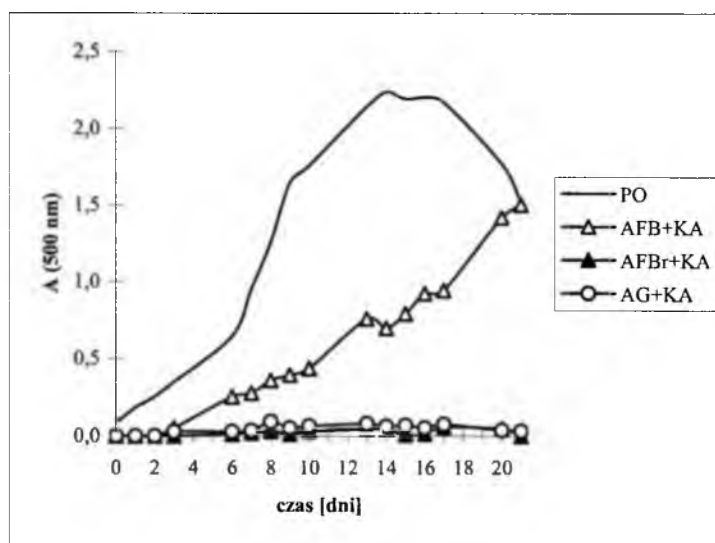
Rys. 2. Zawartość nadtlenków w roztworach kwasu linolowego (próbki z dodatkiem preparatów albuminowych).

Fig. 2. Peroxide contents in linoleic acid solutions (samples with albumin preparations added).



Rys. 3. Zawartość nadtlenuków w roztworach kwasu linolowego (próbki z dodatkiem kwasu askorbino-
wego i BHT)

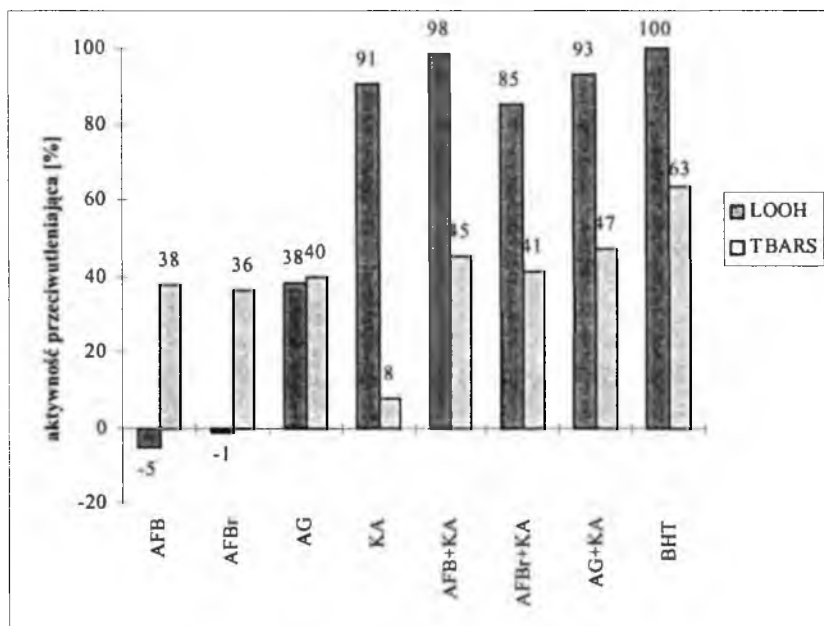
Fig. 3. Peroxide contents in linoleic acid solutions (samples with ascorbic acid and BHT added)



Rys. 4. Zawartość nadtlenuków w roztworach kwasu linolowego (próbki z dodatkiem kwasu askorbino-
wego i preparatów albuminowych)

Fig. 4. Peroxide contents in linoleic acid solutions (samples with ascorbic acid and albumin prepa-
rations added)

Kolejnym etapem pracy było zastosowanie badanych próbek jako przeciwutlenia-czy w emulsjach, w których stopień utlenienia kwasu linolowego mierzono również zawartością nadtlenczków i produktów ich rozpadu (rys. 5.). Albuminy w zależności od rodzaju nasion wykazały bardzo różną aktywność hamowania reakcji tworzenia nad-tlenczków – od minimalnie prooksydacyjnej (AFB) do wyraźnie antyoksydacyjnej (AG). W tym doświadczeniu spośród albumin najlepsze właściwości posiadało białko grochu, były one jednak około dwukrotnie gorsze od wykazywanych przez kwas askorbinowy. Połączenie albumin z KA miało dodatni wpływ na ich aktywność we wszystkich trzech kombinacjach, a w przypadku AFB i AG obserwowano efekt synergistyczny.



Rys. 5. Aktywność przeciwutleniająca preparatów zastosowanych w emulsjach (LOOH = nadtlenci, TBARS = produkty rozpadu nadtlenczków)

Fig. 5. Antioxidant activity of preparations in linoleic acid emulsions (LOOH = peroxides, TBARS = peroxides decomposition products)

Wyraźnie różniące się od powyższych wyniki uzyskano przy pomiarze zawartości produktów rozpadu nadtlenczków. Aktywność preparatów albuminowych była bardzo wyrównana, przy czym najlepsze właściwości posiadało także i w tym przypadku białko grochu. Uwagę zwraca wyjątkowo niska aktywność kwasu askorbinowego, wiadomo jednak, że w tym środowisku może on wykazywać nawet tendencje prooksydacyjne [11]. Zastosowanie układów łączących badane przeciwutleniacze spowodowało pewien wzrost efektywności ich działania ponad wykazywane przez nie oddzielnie.

Wnioski

1. Preparaty albuminowe wykazują właściwości przeciwutleniające porównywalne z BHT, zależą one jednak od zastosowanego środowiska reakcji.
2. Pozytywny wpływ dodatku kwasu askorbinowego na aktywność białek występował w większości doświadczeń, przy czym jednoznaczny efekt synergistyczny zaobserwowano jedynie w układach emulsyjnych.

LITERATURA

- [1] Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F.: Structural analysis of antioxydative peptides from soybean β -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 574.
- [2] Chen, H.-M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., Nokihara, K.: Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 49.
- [3] Chen, Z.-Y., Zhu, Q. Y., Wong, Y. F., Zhang, Z., Chung, H. Y.: Stabilizing effect of ascorbic acid on green tea catechins. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 2512.
- [4] Hayes, R.E., Bookwalter, G.N., Bagley, E.B.: Antioxidant activity of soybean flour and derivatives - a review. *J. Food Sci.*, **42**, 1977, 1527.
- [5] Heinonen, M., Rein, D., Satue-Gracia, M. T., Huang, S.-W., German, J. B., Frankel, E. N.: Effect of protein on the antioxidant activity of phenolic compounds in a lecithin-liposome oxidation system. *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 1998, 917.
- [6] Horubała, A.: Pojemność przeciwutleniająca i jej zmiany w procesach przetwarzania owoców i warzyw. *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, **3**, 1999, 30.
- [7] Kuo, J.-M., Yeh, D.-B., Pan, B. S.: Rapid photometric assay evaluating antioxidative activity in edible plant material. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1999, 3206.
- [8] Saeed, S., Sawthorpe, S. A., Howell, N. K.: Electron spin resonance (ESR) study on free radical transfer in fish lipid-protein interaction, *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 1999, 1809.
- [9] Yamamoto, Y., Kataoka, A., Kitora, M.: Enhancing effect of β -lactoglobulin on the antioxidative activity of α -tocopherol in an emulsion of linoleic acid. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**, 1998, 1912.
- [10] Yen, G.-C., Chen, H.-Y., Lee, C.-E.: Measurement of antioxidative activity in metal ion-induced lipid peroxidation systems. *J. Sci. Food Agric.*, **79**, 1999, 1213.

CHANGES OF PEA AND BEAN ALBUMINS ANTIOXIDANT ACTIVITY INDUCED BY ASCORBIC ACID ADDITION

Summary

Influence of ascorbic acid on antioxidant properties of albumin preparations against linoleic acid solutions and emulsions, as well as DPPH^{*} stable radical scavenging ability were evaluated. In most model systems high activity of albumins was proved. Ascorbic acid addition had the best antioxidant effect in emulsions and resulted in decrease of peroxides in linoleic acid solutions. The biggest changes of antiradical activity after ascorbic acid addition were observed for proteins exhibiting lower scavenging ability. ☒

DOROTA SOSNOWSKA

ZMIANY AKTYWNOŚCI ANTYOKSYDACYJNEJ (+) KATECHINY W WYNIKU UTLENIANIA ENZYMATYCZNEGO

Streszczenie

(+) katechyna wykazuje cenne właściwości biologiczne, jest efektywnym zmiataczem wolnych rodników. W pracy badano wpływ enzymatycznego utleniania (+) katechiny na jej aktywność antyoksydacyjną. Proces utleniania (+) katechiny prowadzono przy udziale polifenolooksydazy (PPO) i tyrozynazy w pH 4 i 7. Aktywność antyoksydacyjną badanych roztworów określano dwoma metodami polegającymi na zmiataniu rodników: DPPH i ABTS. Zmiany zawartości (+) katechiny oraz produkty jej degradacji rejestrowano metodą HPLC i TLC. Szybkość utleniania (+) katechiny była wyższa w obecności PPO niż tyrozynazy. Obniżenie pH środowiska reakcyjnego z 7 do 4 powodowało zmniejszenie szybkości utleniania katechiny. Dwugodzinne utlenianie katechiny (PPO w pH 7) powodowało spadek zawartości tego monomeru o 57% i pojawienie się dimerów i tetramerów. Natomiast efektywność zmiatania stabilnego rodnika DPPH obniżyła się o 25% a ABTS tylko o 12%, co może sugerować, że produkty enzymatycznego utleniania (+) katechiny wykazują pewną aktywność antyoksydacyjną w stosunku do tych rodników.

Wstęp

Badania ostatnich lat wykazały, że cennym składnikiem owoców i warzyw strączkowych są flawanole należące do związków polifenolowych o szkielecie C₆-C₃-C₆. W tkankach roślin flawanole występują zarówno w formie monomerów flawan-3-oli czyli katechin, jak i w formie spolimeryzowanej jako proantocyjanidyny. Z uwagi na dużą liczbę grup hydroksylowych w cząsteczce są one związkami labilnymi, łatwo utleniają się, reagują między sobą i wchodzą w reakcje z innymi składnikami środowiska.

Katechiny są dobrymi substratami dla fenolooksydaz. Pierwszym produktem ich enzymatycznego utleniania są bardzo reaktywne chinony, które ulegają dalszym przemianom do brunatnych melanin, co obniża jakość produktów owocowych, szczególnie

jabłkowych. Na przebieg procesu enzymatycznego brunatnienia ma wpływ wiele czynników, a wśród nich: stężenie i rodzaj substratu, pH środowiska reakcyjnego, aktywność i powinowactwo substratowe polifenolooksydaz (PPO) [4, 6].

Z drugiej zaś strony flawanole wykazują cenne właściwości biologiczne, są bardzo efektywnymi zmiataczami wolnych rodników, które należą do czynników uszkadzających komórki i wywołujących mutacje i nowotwory. Skuteczność zmiatania przez (+) katechinę szczególnie groźnych dla zdrowia anionorodników ponadtlenkowych była 7-krotnie wyższa w porównaniu z kwasem askorbinowym [5], a jako czynnik opóźniający utlenienie LDL katechyna okazała się 10-krotnie skuteczniejsza niż kwas askorbinowy i aż 20-krotnie w porównaniu z α -tokoferolem [10].

Reasumując można stwierdzić, że katechiny są to związki nietrwałe, ulegające łatwo enzymatycznym i nieenzymatycznym przemianom wpływającym na cechy sensoryczne i wartość biologiczną przetworów owocowych.

Natomiast mało jest doniesień na temat wpływu powyższych przemian na aktywność antyoksydacyjną flawanoli.

Celem pracy było określenie zależności pomiędzy stopniem enzymatycznych przemian (+) katechiny, a jej aktywnością antyoksydacyjną.

Material i metody badań

Enzymatyczne utlenianie 0,6 mM (+) katechiny (Sigma) prowadzono z udziałem polifenolooksydazy (PPO) wyizolowanej z jabłek odmiany Lobo [8] lub tyrozynazy (Sigma) ($3,3 \cdot 10^4$ j.a./dm³) w buforze McIlvaine'a o pH 4,0 lub 7,0.

Zmiany zawartości (+)katechiny rejestrowano metodą HPLC [7]. Analizy wykonano przy użyciu chromatografu cieczowego firmy Knauer wyposażonego w detektor UV-VIS i kolumnę LiChrospher-100, RP-18 (5 μ m). Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 cm³/min. Detekcję (+)katechiny prowadzono przy długości fali 280 nm. Fazę ruchomą stanowił układ rozpuszczalników: (A) acetonitryl; (B) woda redestylowana zakwaszona do pH 2,6 85% kwasem orto-fosforowym.

Do badania stopnia polimeryzacji stosowano chromatografię cienkowarstwową na silikażelu G-60 w układzie rozwijającym: toluen – aceton – kwas mrówkowy (3:3:1). Chromatogramy wywołymano 4% roztworem waniliny w CH₃OH/HCl (4:1) [3].

Właściwości przeciwutleniające oznaczano metodami polegającymi na spektrofotometrycznym pomiarze zmian stężenia barwnych rodników:

- 1) stabilnego rodnika DPPH (1,1 diphenyl-2-picrylhydrazyl) – aktywność antyoksydacyjną podano jako stężenie antyoksydanta potrzebne do 50% redukcji DPPH. Czym mniejsza wartość liczbowa IC₅₀ tym wyższa aktywność antyoksydacyjna badanego związku [12],

2) kationorodnika ABTS⁺ (2,2'azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) – wyniki wyrażano jako TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) określający milimolowe stężenie troloxu odpowiadające stężeniu 1mM badanych antyoksydantów. Czym wyższa wartość liczbowa TEAC tym wyższa aktywność antyoksydacyjna badanego związku [9].

Wyniki i dyskusja

Katechiny obok kwasu chlorogenowego i kawowego są polifenolami najbardziej podatnymi na utlenianie enzymatyczne. Szybkość tego procesu zależy m.in. od rodzaju enzymu i pH środowiska. Dla polifenolooksydazy optymalne pH wynosi około 7, ale pH owoców i przetworów owocowych jest znacznie niższe i wynosi 3-4. Wobec tego badania szybkości enzymatycznej degradacji katechiny prowadzono w pH 4 i 7. W tab. 1. przedstawiono zmiany zawartości (+) katechiny w czasie enzymatycznego utleniania rejestrowane metodą HPLC.

Tabela 1

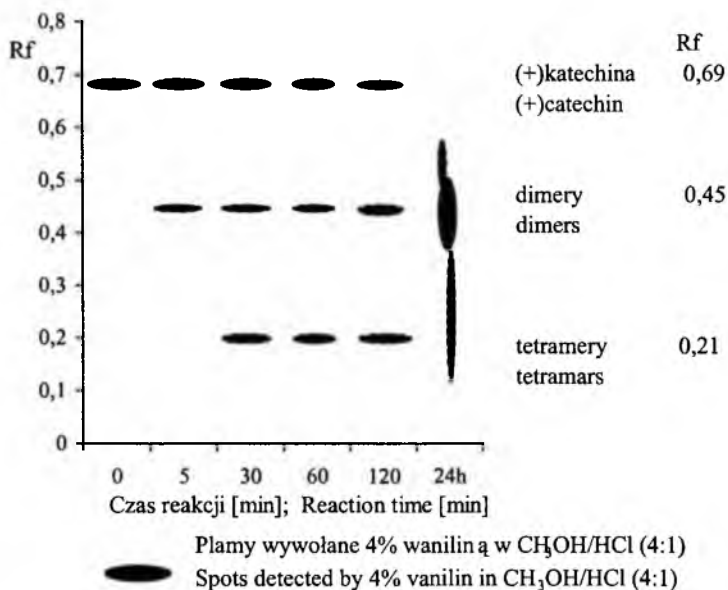
Zmiany zawartości (+) katechiny w wyniku enzymatycznego utleniania.
Changes of (+) catechin contents during enzymatic oxidation.

Czas reakcji Reaction time	Utlenianie katechiny w obecności PPO Enzymatic oxidation of catechin in the presence of PPO		Utlenianie katechiny w obecności tyrozynazy Enzymatic oxidation of catechin in the presence of tyrosinase
	pH = 7	pH = 4.0	pH = 7.0
[min]	Zachowalność Retention [%]	Zachowalność Retention [%]	Zachowalność Retention [%]
0	100	100	100
5	83,4	–	91,0
30	57,4	91,1	90,0
60	48,2	90,0	88,9
120	43,3	92,6	90,6
240	–	86,9	90,6
24h	30,9	82,0	71,5

W początkowym etapie proces enzymatycznego utleniania (+) katechiny w obecności PPO w pH 7 zachodził bardzo szybko – czas połowicznego rozpadu $\tau_{0,5} = 47$ min ($R^2 = 0,9$). Dalsze utlenianie było już znacznie wolniejsze i po 24 godzinach zachowalność substratu wynosiła 30%. Obniżenie pH środowiska reakcyjnego z 7 do 4 powo-

dowało zmniejszenie szybkości utleniania (+) katechiny. Po 47 min. jej zachowalność wynosiła około 90%, a po 24 godzinach 80%. Aktywność tyrozynazy w procesie utleniania katechiny była znacznie niższa niż PPO. W roztworze o pH 7 szybkość brunatnienia była zbliżona do zaobserwowanej z udziałem PPO przy pH 4.

Do kontroli przemian (+) katechiny w procesie enzymatycznego utleniania zastosowano chromatografię cienkowarstwową (rys. 1).



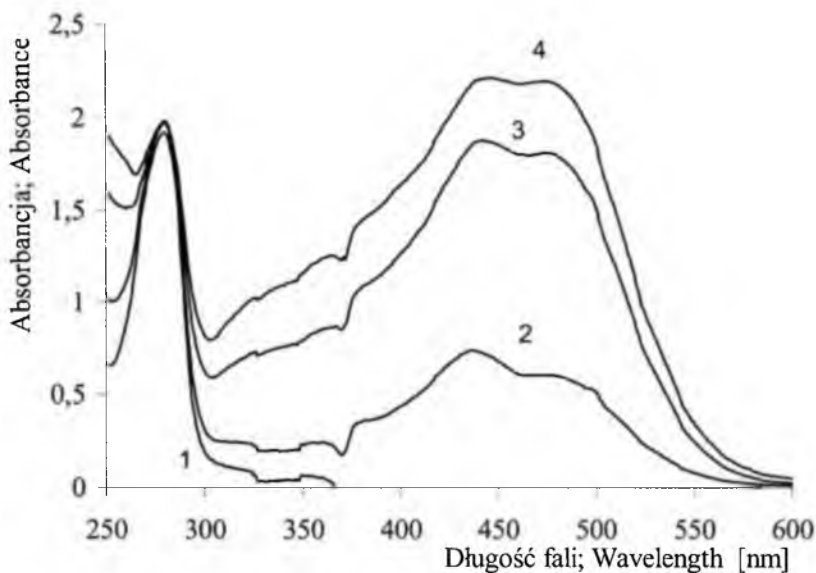
Rys. 1. Chromatogram TLC produktów utleniania (+) katechiny w obecności PPO w pH 7.

Fig. 1. The TLC chromatogram of (+)catechin oxidation products in the presence of PPO at pH 7.

Na chromatogramie TLC (PPO w pH 7) zaobserwowano wyraźny ubytek monomeru (+) katechiny i powstawanie związków o wartości współczynników Rf odpowiadających dimerom i tetramerom tanin skondensowanych [3], które również wykazują aktywność antyoksydacyjną. Po 24 godzinach nie stwierdzono obecności monomeru, natomiast zaobserwowano pojawienie się „ciągnącej się plamy”, wskazującej na pojawienie się szeregu produktów polimeryzacji o zróżnicowanych masach cząsteczkowych. Guyot ze wsp. [2] stwierdził, iż w wyniku utleniania (+) katechiny polifenolooksydazą wyizolowaną z winogron powstawały związki będące izomerami proantocyjanidyn typu A i B.

Natomiast na widmach absorpcji przedstawiających utlenianie katechiny przez PPO w pH 7 (rys. 2) zaobserwowano niewielki wzrost absorbancji przy 280 nm oraz pojawienie się pików w zakresie widzialnym, który odpowiadał barwnym produktom

utleniania (+) katechiny. Według Guyota i wsp. [1], w procesie utleniania (+) katechiny w pH 6 przeważały związki o zabarwieniu żółtym – λ_{\max} 385 i 412 nm, zaś w pH 3 produkty utlenienia (+) katechiny wykazywały maksimum absorpcji przy 280 nm i powstawały jedynie śladowe ilości związków barwnych z maksimum absorpcji przy 400 nm.

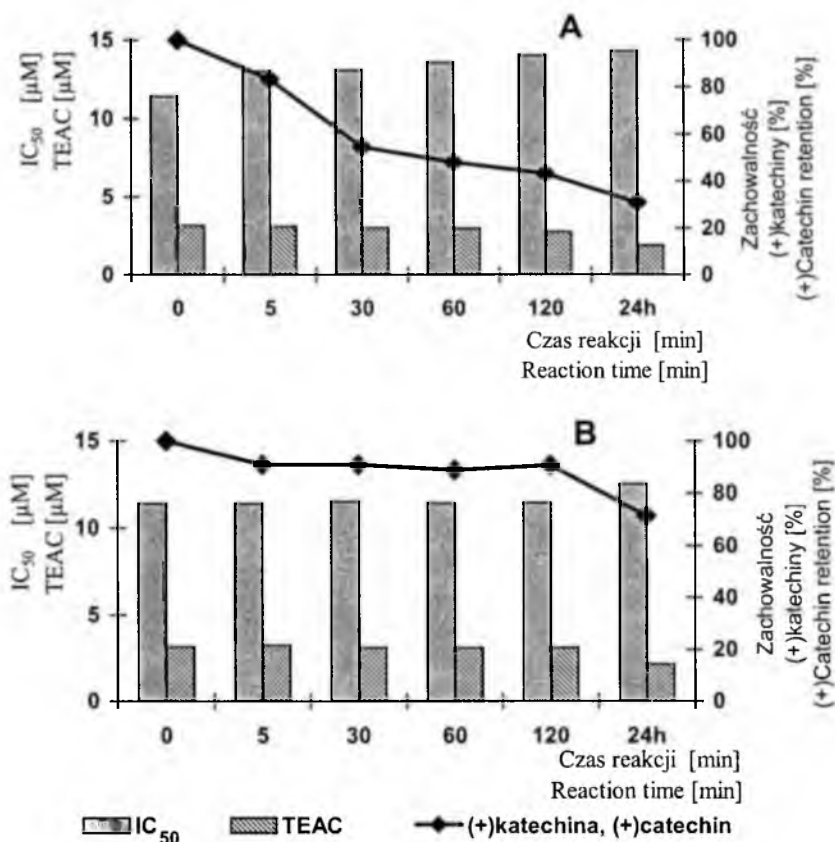


Rys. 2. Widma absorpcji w czasie utleniania (+) katechiny w obecności PPO w pH 7; po czasie: 1 – 0 min; 2 – 10 min; 3 – 30 min; 4 – 60 min.

Fig. 2. Spectra (+)catechin during enzymatic oxidation in the presence of PPO at pH 7; 1 – 0 min; 2 – 10 min; 3 – 30 min; 4 – 60 min.

Aktywność antyoksydacyjną produktów utleniania (+) katechiny określano dwoma metodami polegającymi na spektrofotometrycznym pomiarze zmian stężenia barwnych rodników (rys. 3). Po dwóch godzinach enzymatycznego utleniania (+) katechiny przez PPO w pH 7 spadek zawartości katechiny wynosił 57%, natomiast efektywność zmiatania stabilnego rodnika DPPH (wyrażana jako IC_{50}) obniżyła się o 25% zaś kationorodnika ABTS (wyrażona jako TEAC) tylko o 12%. Dalsze utlenianie (+) katechiny nie powodowało istotnych zmian IC_{50} , zaś współczynnik TEAC obniżył się aż o 40%. Sugerować to może, że produkty enzymatycznego utleniania (+) katechiny wykazują różną aktywność antyoksydacyjną w stosunku do badanych rodników. W obecności tyrozynazy (+) katechiny ulegała utlenieniu znacznie wolniej, a właściwości antyoksydacyjne badanych roztworów tylko w niewielkim stopniu uległy zmianie. Wcześniejsze badania własne wykazały również, iż w czasie ogrzewania roztwo-

rów (+) katechiny w 90°C, w pH 7 pomimo szybkiego spadku zawartości tego monomeru właściwości antyoksydacyjne badanych roztworów obniżały się znacznie wolniej (określane jako IC_{50} w metodzie z DPPH) [11].



Rys. 3. Relacja pomiędzy zdolnością zmiatania rodników DPPH [IC_{50} - μ M] oraz kationorodnika $ABTS^+$ [TEAC - μ M] a spadkiem zawartości (+) katechiny [%] w czasie utleniania roztworów modelowych w pH 7,0 w obecności: A – PPO; B – tyrozynazy.

Fig. 3. Influence of enzymatic oxidation on the relationship between antioxidant activity determined by DPPH [IC_{50} - μ M] and $ABTS^+$ [TEAC - μ M] radical scavenging and (+) catechin retention [%] in the presence: A – PPO; B – tyrosinase.

Podsumowanie

Szybkość enzymatycznego utleniania w dużej mierze zależy od rodzaju zastosowanego enzymu oraz pH środowiska reakcyjnego. Proces dwugodzinnego utleniania

(+) katechiny w obecności PPO w pH 7 powodował obniżenie zawartości tego monomeru o około 60% oraz pojawienie się nowych związków o współczynnikach Rf odpowiadających dimerom i tetramerom tanin skondensowanych. Aktywność antyoksydacyjna tych roztworów ulegała obniżeniu znacznie wolniej niż spadek zawartości katechiny (IC₅₀ o 25%, zaś TEAC tylko o 12%). Może to być spowodowane tym, iż produkty enzymatycznego utleniania (+) katechiny wykazują aktywność antyoksydacyjną w stosunku do badanych rodników.

LITERATURA

- [1] Guyot S., Cheynier V., Souquet J.M., Moutounet M.: Influence of pH on the enzymatic oxidation of (+) catechin in model systems; *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 2458.
- [2] Guyot S., Vercauteren J., Cheynier V.: Structural determination of colourless and yellow dimers resulting from (+)catechin coupling catalysed by grape polyphenoloxidase; *Phytochem.*, **42**, 1996, 1279.
- [3] Lea A.G.H., Bridle P., Timberlake C.F., Singleton V.L.: The procyanidins of white grapes and wines; *Am. J. Enol. Vitic.*, **30**, 4, 1979, 289.
- [4] Łoś J., Wilska-Jeszka J., Pawlak M.: Enzymatic oxidation of polyphenols in fruit products and model solutions.; *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **5/46**, 1996, 83.
- [5] Oszmiański J., Lamer-Zarawska E.: Antymutagenna i antykancerogenna aktywność roślinnych polifenoli; *Przem. Spoż.*, **10**, 1992, 253.
- [6] Oszmiański J., Lee C.Y.: Enzymatic oxidative reaction of catechin and chlorogenic acid in a model system; *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 1990, 1202.
- [7] Oszmiański J.: Przemiany enzymatyczne związków fenolowych w układach modelowych i ekstraktach owocowych.; *Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu, Rozprawy*, **74**, 1988, 1.
- [8] Owusu-Ansah Y.I.: Polyphenoloxidase in wild rice (*Zizania palustris*); *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 1989, 901.
- [9] Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M. Rice-Evans C.: Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay; *Free Radic. Biol. Med*, **26**, 1999, 1231.
- [10] Vinson J.A., Dabbagh Y.A., Serry M.M., Jang J.: Plant flavonoids, especially tea flavonols are powerful antioxidants using an in vitro model for heart disease; *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 2800.
- [11] Wilska-Jeszka J., Sosnowska D.: Antioxidant activity of anthocyanins in relation to other phenolic compounds present in fruits, *Proceedings of Euro Food Chem X - Functional Foods – A new challenge for the food chemists*, Budapeszt, 1999, 423.
- [12] Yem G.C., Chen H.Y.: Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity; *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 27.

CHANGES OF (+)CATECHIN ANTIOXIDANT ACTIVITY DURING ENZYMATIC OXIDATION

S u m m a r y

The effect of enzymatic oxidation of (+) catechin on its antioxidant activity was investigated. Enzymatic oxidation of (+) catechin in the presence of apple polyphenol oxidase (PPO) and tyrosinase was studied at 25°C and in solution at pH 4 and 7. The antioxidant activity was determined by two methods: ABTS and DPPH radical scavenging. (+) Catechin and the reaction products were monitored by HPLC and TLC.

The rate of reaction in the presence of PPO at pH 7 was higher than at pH 4. The reaction products of catechin oxidation were dimers and tetramers. The rate of oxidation of catechin in the presence of tyrosinase was slower than in the presence of PPO. Antioxidant activity of catechin after two hours oxidation (PPO at pH 7) was reduced about 25% in DPPH method (expressed as IC_{50}) and only about 12% in ABTS method (expressed as TEAC), in spite of big decrease content of monomer catechin (57%). This finding indicates that as a result of (+) catechin enzymatic oxidation the compounds with antioxidant activity are formed. ☒

URSZULA MICHALSKA, HENRYK JELEŃ, ERWIN WĄSOWICZ

CHARAKTERYSTYKA ZWIĄZKÓW LOTNYCH WYIZOLOWANYCH Z ZAKWASU Z MĄKI ŻYTNIEJ

Streszczenie

Celem pracy była analiza związków lotnych wytwarzanych przez mikroorganizmy podczas naturalnej fermentacji mąki żytniej z wodą, przeznaczoną do przygotowania żurku. Po 24, 48, 72 h fermentacji w 20°C pobierano próby i analizowano związki lotne oraz kwasy organiczne metodami chromatograficznymi, a także monitorowano wartość pH.

Do wyodrębnienia z zakwasu związków lotnych zastosowano metodę destylacyjno - ekstrakcyjną oraz techniki analizy fazy nadpowierzchniowej (tzw. headspace): statyczny headspace i dynamiczny headspace. Do rozdzielenia związków lotnych wykorzystano techniki chromatografii gazowej stosując kolumny kapilarnie z fazami stacjonarnymi o zróżnicowanej polarności HP - 5 i Stabilwax połączone z detektorem ECD, FID, spektrometrem masowym oraz analizę olfaktometryczną.

Do rozdzielenia kwasów organicznych zastosowano technikę wysokosprawnej chromatografii cieczowej z kolumną HPX - 87H oraz detektorem adsorpcyjnym Dual Absorbance Detector 2487.

W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano 26 związków lotnych: 6 kwasów, 7 alkoholi, 4 aldehydy, 5 estrów, 2 ketony, 1 związek heterocykliczny i 1 węglowodór.

Wstęp

O jakości żywności fermentowanej decydują mikroorganizmy, których metabolity mają z reguły korzystny wpływ na aromat i smak produktu. Dużym zainteresowaniem naukowców cieszą się bakterie mlekowe, które stosowane są w procesach fermentacji zakwasów chlebowych [7, 22-25], do produkcji sera twarogowego i serów dojrzewających [21, 26], fermentowanych napojów mlecznych [11, 17], wytwarzania kiszonek roślinnych [27], dojrzewania niektórych gatunków win [13], fermentacji mięsa, wędlin, ryb [2, 8], nasion roślin strączkowych, oliwek, kawy, sporządzania żurku oraz wielu innych produktów [9, 10, 15].

Przedmiotem pracy była analiza związków lotnych oraz kwasów organicznych wytwarzanych przez mikroorganizmy w żurku. Do chwili obecnej zidentyfikowano kilkadziesiąt związków chemicznych, które są produktami metabolizmu bakterii mlekowych i innych mikroorganizmów [10, 21, 26]. Jednak brak jest opracowań dotyczących związków smakowo-zapachowych powstających podczas naturalnej fermentacji żurku, stosowanego do przygotowania zupy. W związku z powyższym celem niniejszej pracy była charakterystyka tych związków. Powstające w procesie fermentacji związki lotne oraz kwasy organiczne analizowano technikami GC, GC/MS i HPLC.

Material i metody badań

Do badań użyto mąkę razową z żyta odmiany Dańkowskie Złote, wyprodukowaną w gospodarstwie ekologicznym w Okonku. Proces fermentacji mieszaniny mąki żytniej z wodą w proporcjach 4 : 1 (v/v) prowadzono w temperaturze 20°C przez trzy dni. Próby pobierano po 24, 48 i 72 h fermentacji oraz monitorowano wartość pH.

Analiza związków lotnych metodami chromatografii gazowej

1) Wyodrębnianie związków lotnych metodą Nickersona - Likensa

Zasada metody opiera się na destylacji związków lotnych z parą wodną i jednoczesnej ich ekstrakcji niskowrzącymi rozpuszczalnikami organicznymi lub ich mieszaniną. Izolację przeprowadzono w aparacie opisanym przez Likensa i Nickersona [12], później zmodyfikowanym przez Flath a i Forrey a [5]. Do analizy użyto 2 litry zakwasu oraz 20 ml mieszaniny izopentan/eter w stosunku 1:1 (v/v) z tetradkanem jako standardem wewnętrznym w ilości 4 µl/ml. Po zakończeniu ekstrakcji (2h) próby zagęszczano do objętości 4 ml, wymrażano wodę i наносzono na chromatograf gazowy.

2) Wyodrębnianie związków lotnych metodą barbotażu

Próba o objętości 2 litrów została umieszczona w kolbie Erlenmeyera o pojemności 5 litrów, której korek był wyposażony w rurkę doprowadzającą gaz do dna kolby oraz dwa wyloty zakończone pułapkami, wypełnionymi polimerem Tenax GR (Alltech Associates, USA). Tenax w ilości 120 mg był umieszczany w rurce o średnicy zewn. 6 mm (średnica wewn. 4 mm), pomiędzy zatyczkami z silanizowanej wełny szklanej. Przed analizą pułapki były kondycjonowane w temp. 200°C przez 3 h przy przepływie azotu 5.0 150 ml/min, a następnie ochłodzone do temperatury pokojowej.

Próbka umieszczona w kolbie była przedmuchiwana azotem 5.0 (przepływ 100 ml/min, 1 h). Wyodrębnianie związków lotnych przeprowadzono w temperaturze 20°C. Ekstrahowane w ten sposób związki lotne były adsorbowane na powierzchni polimeru. Desorpcję związków przeprowadzono przemywając pułapkę 1 ml mieszaniny eter etylowy/izopentan z tetradkanem jako standardem wewnętrznym (4 µl/ml). Ekstrakt

zagęszczano do objętości około 100 μl w strumieniu azotu i наносono na kolumnę chromatografu gazowego.

3) Wyodrębnianie związków lotnych metodą statycznego headspace

Analizy przeprowadzono za pomocą automatycznego samplera HP 7694, umożliwiającego nastrzyk stałej objętości par z nadanalitu na kolumnę chromatograficzną. Do analizy użyto po 10 ml próbki. Zakwas sączono przez sączek bibułowy (Filtrak 389), a następnie odmierzoną objętość zamykano w naczyniu o pojemności 20 ml, które było następnie termostatowane przez 20 min w temp. 50°C. Po ustaleniu się w naczyniu równowagi, 1 ml par był nastrzykiwany na kolumnę chromatografu gazowego.

Identyfikacja związków lotnych

Identyfikację związków lotnych przeprowadzono za pomocą spektrometrii masowej, porównując widma analizowanych substancji z widmami masowymi zawartymi w bibliotece NBS 75K, zawierającej około 75000 związków, a także przez porównanie widm i czasów retencji ze standardami.

Stosowana aparatura

Chromatograf gazowy firmy Hewlett Packard 5890 II z detektorem masowym MSD 5971B. Rozdział związków lotnych przeprowadzono na kolumnie MDN 5 (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm). Próby наносono w ilości 2 μl w systemie splitless.

Chromatograf gazowy firmy Hewlett Packard 5890II z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym FID, wyposażonym w kolumnę HP-5 (30 m \times 0,32 mm \times 0,25 μm) i przystawkę umożliwiającą wachanie frakcji.

Chromatograf gazowy firmy Hewlett Packard 6890 z detektorem płomieniowo-jonizacyjnym FID i detektorem selektywnego wychwytu elektronów ECD. Chromatograf współpracował z przystawką do analizy fazy nadpowierzchniowej Hewlett Packard 7694. Rozdział związków lotnych przeprowadzono na kolumnie kapilarnej Stabilwax (30 m \times 0,32 mm \times 1,0 μm) w przypadku detektora FID oraz HP-5 (30 m \times 530 μm \times 1,5 μm) przy użyciu detektora ECD.

Analiza kwasów organicznych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej HPLC

Analizy wykonano za pomocą chromatografu cieczowego firmy Waters 2690 z użyciem detektora Dual Absorbance Detector 2487 przy następujących parametrach: eluent 0,0004 M H_2SO_4 , kolumna HPX-87H firmy BIORAD, temp. rozdziału 35°C, przepływ 0,6 ml/min, długość fali 210 nm. Po wirowaniu próby przy 1500 \times g przez 5 minut наносono ją na kolumnę w ilości 10 μl . Analizę jakościową przeprowadzono poprzez porównanie chromatogramów i czasów retencji ze standardami.

Wyniki

W żurkach zidentyfikowano 26 związków lotnych, w tym: 6 kwasów, 7 alkoholi, 4 aldehydy, 5 estrów, 2 ketony, 1 związek heterocykliczny i 1 węglowodór (tab. 1).

Tabela 1

Związki lotne wyizolowane podczas naturalnej fermentacji mąki żytniej z wodą.
Volatile compounds isolated during spontaneous fermentation of rye flour with water.

Grupa związków Group of compounds	Związek Compound	Metoda izolacji Isolation method	Występowanie związków podczas fermentacji Presence of compounds during fermentation		
			t = 24 godz./h	t = 48 godz./h	t = 72 godz./h
			(5,86)*	(4,36)*	(3,81)*
aldehydy aldehydes	heksanal / hexanal	DH,SDE	+	+	+
	heptanal / heptanal	DH,SDE	+	+	+
	nonanal / nonanal	DH,SDE	+	+	+
	aldehyd octowy / acetaldehyde	SH	+	+	+
alkohole alcohols	3-metylo-1-butanol / 3-methylbutanol	SH,SDE	+	+	+
	1-heksanol / 1-hexanol	DH,SDE	+	+	+
	2-etylo-1-heksanol / 1-hexanol,2-ethyl ethanol / ethanol	DH,SDE	+	+	+
	1-propanol / 1-propanol	SH	+	+	+
	butanol / butanol	DH,SDE	+	+	+
	1-oktanol / 1-octanol	SH	+	+	+
estry esters	ester etylowy kwasu heksadecanowego / hexadecanoic acid ethyl ester	DH,SDE	+	+	+
	octan izoamylu / isoamyl acetate	SH,SDE	+	+	-
	octan etylu / ethyl acetate	SH,SDE	+	+	+
	kapronian etylu / ethyl capronate	SH,SDE	+	-	-
	kaprylan etylu / ethyl caprylate	SH,SDE	-	+	+
ketony ketones	diacetyl / diacetyl	SH,SDE	+	+	+
	pentadion / pentadion	SH,SDE	+	+	+
kwasy acids	mlekowy / lactic	HPLC	+	+	+
	propionowy / propionic	HPLC	+	+	+
	octowy / acetic	HPLC	+	+	+
	mrówkowy / formic	HPLC	+	+	+
	oktanowy / octanoic	DH,SDE	+	+	+
heksadecanowy / hexadecanoic	DH,SDE	+	+	+	
węglowodory hydrocarbons	p-ksylen / p-xylene	DH,SDE	+	+	+
związki heterocykliczne heterocyclic compounds	2-pentylo-furan / 2-pentyl furan	DH,SDE	+	+	+

t – czas poboru próby /sampling time

DH –metoda dynamicznego headspace / techniques dynamic headspace

SH –metoda statycznego headspace / techniques static headspace

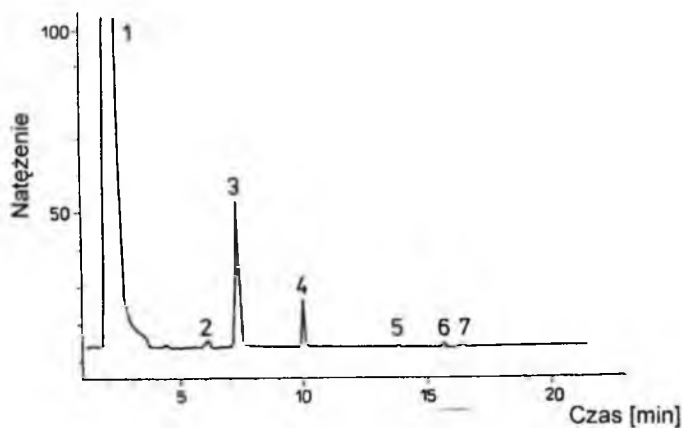
SDE –metoda Nickersona/Likensa / Nickerson/Likens method

HPLC –metoda wysokosprawnej dchromatografii cieczowej / high performance liquid chromatography

+/- obecność/brak związku po 24, 48, 72 godz. fermentacji / presence/absence of compound after 24, 48 and 72 h of fermentation

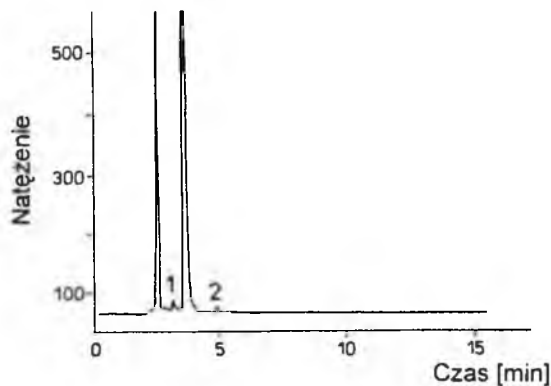
* W nawiasach podano średnią wartość pH z 6 serii / average value of pH from 6 series is given in brackets.

Stosując metodę statycznego headspace z użyciem detektora FID wykryto obecność takich związków jak: aldehyd octowy, octan etylu, octan izoamylu, kaprylan etylu, kapronian etylu, etanol, propanol, butanol i 3 – metylo-1-butanol (rys. 1), natomiast zastosowanie detektora ECD umożliwiło identyfikację diacetylu i pentadionu (rys. 2).



Rys. 1. Chromatogram związków lotnych wyizolowanych techniką statycznego headspace podczas naturalnej fermentacji mąki żytniej z wodą, kolumna Stabilwax, detektor FID, 1 – aldehyd octowy, 2 – octan etylu, 3 – etanol, 4 – propanol, 5 – butanol, 6 – 3-metylo-1-butanol, 7 – kapronian etylu, st – standard.

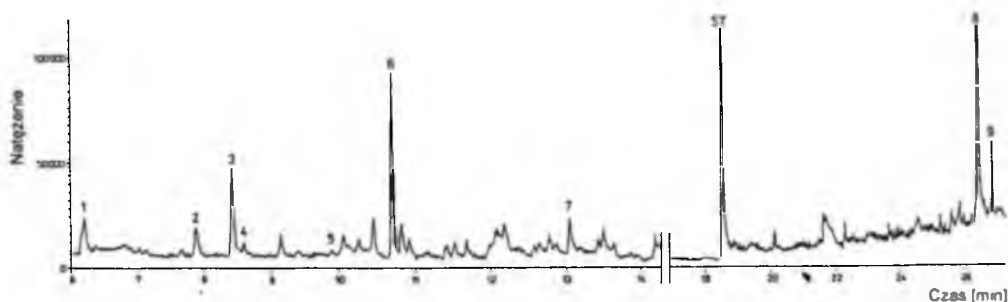
Fig. 1. Gas chromatogram of volatiles isolated during spontaneous fermentation of rye flour with water by using static headspace, Stabilwax capillary column, detector FID, 1–acetaldehyde, 2 – ethyl acetate, 3 – ethanol, 4 – propanol, 5 – butanol, 6 – 3–methylbutanol, 7 - ethyl capronate, st – standard.



Rys. 2. Chromatogram związków lotnych wyizolowanych techniką statycznego headspace podczas naturalnej fermentacji mąki żytniej z wodą, detektor ECD, kolumna HP – 5, 1 – diacetyl, 2 – pentadion, st – standard.

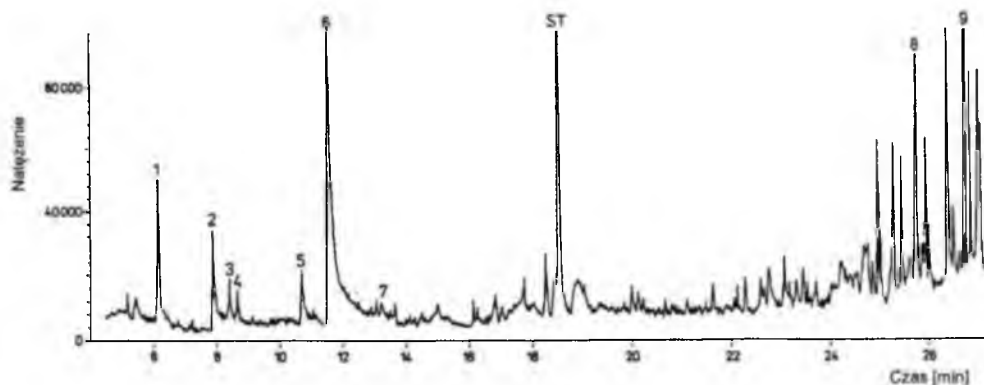
Fig. 2. Gas chromatogram of volatiles isolated during spontaneous fermentation of rye flour with water by using static headspace technique, detector ECD, HP – 5 capillary column, 1 – diacetyl, 2 – pentadione, st – standard.

Pozostałe związki lotne, tj. propanol, 1-oktanol, 2-etylo-1-heksanol, heksanal, heptanal, nonanal, p-ksylen, kwas oktanowy, kwas heksadekanowy, 2-pentylo-furan oraz ester etylowy kwasu heksadekanowego zostały wykryte po zastosowaniu metody destylacyjno-ekstrakcyjnej i metody dynamicznego headspace (rys. 3 i 4). Z kolei ekstrakty uzyskane metodą Likensa/Nickersona użyto do analizy olfaktometrycznej (tab.



Rys. 3. Chromatogram związków lotnych wyizolowanych techniką dynamicznego headspace podczas naturalnej fermentacji mąki żytniej z wodą, analiza GC – MS, kolumna MDN – 5, 1 – heksanal, 2 – 1-heksanol, 3 – p-ksylen, 4 – heptanal, 5 – 2-pentylo-furan, 6 – 2-etylo-1-heksanol, 7 – nonanal, 8 – kwas heksadekanowy, 9 – ester etylowy kwasu heksadekanowego, st – standard.

Fig. 3. Gas chromatogram of volatiles isolated during spontaneous fermentation of rye flour with water by using dynamic headspace technique, GC – MS analysis, MDN – 5 capillary column, 1 – hexanal, 2 – 1-hexanol, 3 – p-xylene, 4 – heptanal, 5 – 2-pentyl furan, 6 – 2-ethyl 1-hexanol, 7 – nonanal, 8 – hexadecanoic acid, 9 – hexadecanoic acid ethyl ester, st – standard.



Rys. 4. Chromatogram związków lotnych wyizolowanych metodą destylacyjno – ekstrakcyjną podczas naturalnej fermentacji mąki żytniej z wodą, analiza GC – MS, kolumna MDN – 5, 1 – heksanal, 2 – 1-heksanol, 3 – p-ksylen, 4 – heptanal, 5 – 2-pentylo-furan, 6 – 2-etylo-1-heksanol, 7 – nonanal, 8 – kwas heksadekanowy, 9 – ester etylowy kwasu heksadekanowego, st – standard.

Fig. 4. Gas chromatogram of volatiles isolated during spontaneous fermentation of rye flour with water by using simultaneous steam distillation and extraction, GC – MS analysis, MDN – 5 capillary column, 1 – hexanal, 2 – 1-hexanol, 3 – p-xylene, 4 – heptanal, 5 – 2-pentyl furan, 6 – 2-ethyl 1-hexanol, 7 – nonanal, 8 – hexadecanoic acid, 9 – hexadecanoic acid ethyl ester, st – standard.

Tabela 2

Związki lotne wyizolowane metodą Nickersona/Likensa podczas naturalnej fermentacji mąki żytniej z wodą, detektor FID.

List of odour – active compounds isolated by using Nickerson/Likens method during spontaneous fermentation of rye flour with water, detector FID.

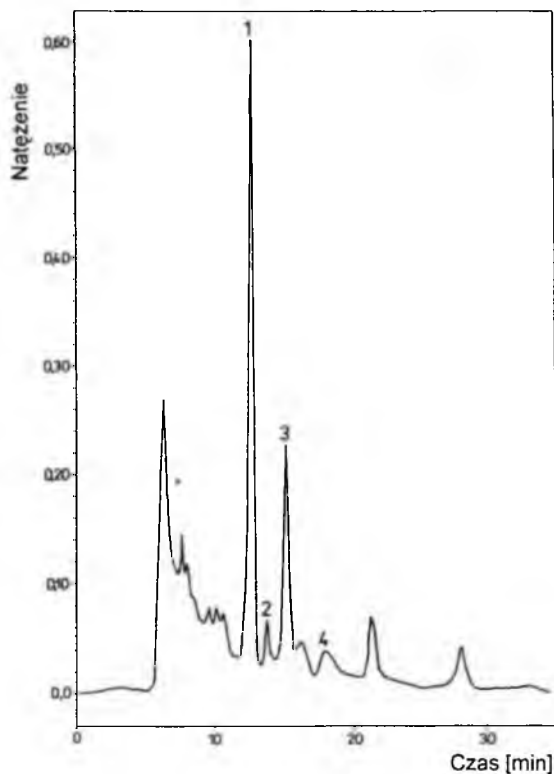
Czas retencji Retention time	RI	Nazwa związku Compound's name	Zapach Odour type
1.5			eterowy / etheric
2.0		diacetyl / diacetyl	maślany / buttery
2.2			nieprzyjemny, olejowy unpleasant, oily
3.0	504.20	1 – propanol / 1-propanol	
3.3			bardzo nieprzyjemny very unpleasant
4.4		toluen* / toluen	nieprzyjemny, olejowy unpleasant, oily
4.8	710	heksanal* / hexanal	roślinny, trawiasty floral, grassy
5.2			bardzo nieprzyjemny very unpleasant
5.7			kwiatowy / flowery
6.3			orzechowy / nutty
6.5	864.31	1 – heksanol / 1-hexanol	
7.0			tłuszczowy / fatty
7.2	911.48	heptanal / heptanal	
7.3			ziemniaczany / potato-like
8.7			grzybowy / mushroom-like
9.9	1045.08	2-etylo-1- heksanol 2- ethylo-1-hexanol	
10.8	1090.17	1 - oktanol* / 1-octanol	grzybowy / mushroom-like
11.3	1120.69	nonanal* / nonanal	ogórkowy / cucumber-like
11.9			walerianowy / valerian-like
12.3			chemiczny / chemical
12.7			przyjemny / pleasant
12.9	1193.06	kwas oktanowy / octanoic acid	
13.1			roślinny / floral
14.4			wosk, parafina / wax, parafin
15.0			kwiatowy, słodki, ciężki flowery, sweet, heavy
15.5			grzybowy / mushroom-like
16.3			owocowy / fruity
21.1			selerowy / celery-like
26.4	2170	ester etylowy kwasu heksadekanowego hexadecanoic acid ethyl ester	

* - czas retencji związku zbliżony do czasu retencji standardu / the retention time of compound is similar to the retention time of standard

RI – indeks retencji / retention index.

2), ale nie odnotowano zapachu 1-propanolu, 1-heksanolu, heptanal, 2-etylo-1-heksanolu, kwasu oktanowego i estru etylowego kwasu heksadecanowego.

Wysokosprawna chromatografia cieczowa umożliwiła rozdział takich kwasów, jak: kwas mlekowy, octowy, mrówkowy i propionowy (rys. 5).



Rys. 5. Chromatogram kwasów organicznych rozdzielonych techniką HPLC podczas naturalnej fermentacji mąki żytniej z wodą, detektor Dual Absorbance Detector 2487, kolumna HPX – 87H, 1 – kwas mlekowy, 2 – kwas mrówkowy, 3 – kwas octowy, 4 – kwas propionowy.

Fig. 5. HPLC chromatogram of organic acids separated during spontaneous fermentation of rye flour with water, Dual Absorbance Detector, HPX – 87H column, 1 – lactic acid, 2 – formic acid, 3 – acetic acid, 4 – propionic acid.

Dyskusja

W celu pełnej charakterystyki lotnych metabolitów bakterii mlekowych i innych mikroorganizmów w zakwasie z mąki żytniej zastosowano kilka metod. Aby zapewnić wyodrębnienie jak największej liczby związków lotnych, zróżnicowanych pod względem lotności i polarności, zastosowano do ich izolacji trzy techniki. Metoda Nickerso-

na/Likensa pozwoliła na wyizolowanie wysokowrzących związków zarówno polarnych, jak i niepolarnych. Propanol, 1-oktanol, 2-etylo-1-heksanol, heksanal, heptanal, nonanal, p-ksylen, 2-pentylo furan, kwas oktanowy i heksadekanowy oraz ester etylowy kwasu heksadekanowego były wykrywane przez innych autorów w świeżym mleku [16], serach [4, 21, 26, 19], mięsie [6], w procesie fermentacji zakwasów chlebowych [9], a także 1-propanol, 1-heksanol, 1-oktanol i p-ksylen w papai. Wykryte związki lotne adsorbowano również na polimerze Tenax GR, używanym w metodzie dynamicznego headspace. Metoda umożliwia oznaczanie związków o charakterze hydrofobowym występujących w niskich stężeniach. Heksanal, heptanal i nonanal zidentyfikowano w produktach mleczarskich [19, 20], a 1-propanol jest obecny w procesie dojrzewania sera [28].

Metodę statycznego headspace wybrano w celu oznaczenia związków niskowrzących, najbardziej lotnych, o charakterze głównie hydrofobowym. Przy użyciu detektora FID wykryto aldehyd octowy, etanol, propanol, butanol, 3-metylo-1-butanol, octan etylu, octan izoamylu, kapronian etylu i kaprylan etylu, które były także identyfikowane w serach [1, 18, 21]. Detektor ECD, umożliwiający wykrywanie śladowych ilości związków wykazujących powinowactwo elektronowe, pozwolił na oznaczenie w badanych próbach diacetylu [22] i pentadienu.

Nie rozpoznano zapachu wszystkich związków, czego przyczyną może być niskie stężenie. Większość związków lotnych ma określony próg wykrywalności i charakterystyczny zapach. Z literatury wiadomo, że kwas oktanowy ma zapach kozi, mydlany lub woskowy, zależnie od stężenia [3], 2-pentylo-furan przyjemny posmak gotowanego mięsa [6], estry zapach kwiatowy lub owocowy natomiast aldehydy trawiasty [1].

W celu oznaczenia kwasów organicznych zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową, która służy do rozdzielania zarówno związków lotnych o małej masie molowej, jak i polimerów, a więc stanowi doskonałe uzupełnienie chromatografii gazowej. Kwas mlekowy nie posiada charakterystycznego zapachu, ale wpływa na smak produktu. Kwas octowy, mrówkowy i propionowy wywołują między innymi ostry posmak. Zidentyfikowane kwasy są obecne także w wielu produktach mleczarskich i mięsie [14].

Wnioski

1. W wyniku przeprowadzonych analiz w zakwasie z mąki żytniej zidentyfikowano 26 związków w tym: 6 kwasów, 7 alkoholi, 4 aldehydy, 5 estrów, 2 ketony, 1 związek heterocykliczny i 1 węglowodór.
2. Analiza olfaktometryczna związków lotnych nie wykazała obecności jednego związku odpowiedzialnego za aromat zakwasu. W związku z tym należy przypuszczać, że aromat zakwasu jest wypadkową zapachu zidentyfikowanych związków, w szczególności kwasów organicznych.

3. Dla pełnej charakterystyki związków lotnych w zakwasie z mąki żytniej należy stosować różne metody ich izolacji: metody destylacyjno – ekstrakcyjne oraz techniki izolacji fazy nadpowierzchniowej.

Literatura

- [1] Arora G., Cormier F., Lee B.: Analysis of odor – active volatile in Cheddar cheese headspace by multidimensional GC/MS/sniffing, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 1995, 748.
- [2] Bogaczek R., Napierała W.: Kwas mlekowy- jakość, właściwości i kierunki zastosowań, *Przem. Spoż.*, **6**, 1998, 43.
- [3] Brennan C., Kimha J., Lindsay R.: Aroma properties and threshold of some branched-chain and other minor volatile fatty acids occurring in milkfat and milk lipids, *J. Sens. Stud.*, **5**, 1989, 105.
- [4] Christensen K., Reineccius G.: Aroma extract dilution of aged cheddar cheese, *J. Food Sci.*, **60**, 1995, 218.
- [5] Flath R., Forrey R.: Volatile compounds of papaya (*Carica papaya* L., Solo Variety), *J. Agric. Food Chem.*, **25**, 1977, 103.
- [6] Greenberg M.: Characterization and comparison of flavor volatiles in meat by products. In : *Flavour 1981*. Walter de Gruyter & Co., 1981.
- [7] Haberowa H., Włodarczyk M., Haber T.: Badania nad mikroflorą pszenżytnich międzyproduktów piekarskich ze szczególnym uwzględnieniem bakterii mlekowych i ich zdolności kwaszących. *Przeгляд Piekarsko-Cukierniczy*, **44**, 1996, 37.
- [8] Hames W., Tichaczek P.: The potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food. *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, **198**, 1994, 193.
- [9] Hansen B., Hansen A.: Volatile compounds in wheat sourdoughs produced by lactic acid bacteria and sourdough yeasts, *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, **198**, 1994, 202.
- [10] Kavovicova J., Drdak M., Grief G.: The choice of strains of *Lactobacillus* species for the lactic acid fermentation of vegetable juice, *Eur. Food Res. Techn.*, **210**, 1999, 53.
- [11] Kosikowska M., Jakubczyk E.: Napoje mleczne z udziałem tradycyjnych i nowych mikroorganizmów, *Przem. Spoż.*, **8**, 1997, 12.
- [12] Likens S., Nickerson G.: *Proc. Am. Soc. Brev. Chem.*, 1964, 5.
- [13] Lonvand-Funel A.: Lactic acid bacteria in the quality improvement and deprecitation of wine, *Int. Dairy J.*, **76**, 1999, 317.
- [14] Marsili R.: Monitoring chemical changes in Cheddar cheese during aging by high performance liquid chromatography and gas chromatography techniques, *J. Dairy Sci.*, **68**, 1985, 3155.
- [15] Mayra-Makinen A., Bigret M.: Industrial Use and Production of Lactic Acid Bacteria. In : *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker, Inc., 1993, 65.
- [16] Moio L., Dekimpe J., Etievant P., Addeo F.: Neutral volatile compounds in the raw milks from different species, *J. Dairy Res.*, **60**, 1993, 199.
- [17] Motyl J., Libudzisz Z.: Właściwości probiotyczne bakterii mlekowych i ich wykorzystanie w przetwórstwie mleczarskim, *Przeгляд Mleczarski*, **8**, 1996, 72.
- [18] Milo C., Reineccius G.: Identification and quantification of potent odorants in regular-fat and low-fat mild Cheddar cheese, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 1997, 3590.
- [19] Najera A., Barron L., Barcina Y.: Changes in free fatty acids during the ripening of Idiazabal cheese: influence of brining time and smoking, *J. Dairy Res.*, **61**, 1994, 281.

- [20] Park S., Goins R.: Determination of volatile lipid oxidation products by dynamic-headspace-capillary gas chromatographic analysis with application to milk-based nutritional products, *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1992, 1581.
- [21] Paulsen P., Kowalewska J., Hammond E., Glatz B.: Role of microflora in production of free fatty acids in flavor in Swiss cheese, *J. Dairy Sci.*, **63**, 1980, 912.
- [22] Preininger M., Warmke R., Grosch W.: Identification of the character impact flavour compounds of Swiss cheese by sensory studies of models, *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, **202**, 1996, 30.
- [23] Staszewska E., Ambroziak Z., Janik M.: Kultury starterowe- ich funkcje i zastosowanie w produkcji chleba. *Przegląd Piekarsko-Cukierniczy*, **43**, 1995, 4.
- [24] Staszewska E., Banecki H.: Prowadzenie procesów fermentacyjnych w produkcji pieczywa z mąki pszenżytniej, *Przegląd Piekarsko-Cukierniczy*, **38**, 1990, 6.
- [25] Trojanowska K.: Mikroorganizmy w żywności, sojuszniczy czy wrogowie. PTTŻ, Poznań 1995.
- [26] Urbach G.: Contribution of lactic acid bacteria to flavour compound formation in dairy products, *Int. Dairy J.*, **5**, 1995, 877.
- [27] Warمیńska-Radyłko I., Laniewska-Moroz Ł., Kujawa K.: Bakterie propionowe w fermentowanych sałatkach warzywnych, *Przem. Spoż.*, **7**, 1997, 38.
- [28] Yang W., Min B.: Dynamic headspace analyses of volatile compounds of Cheddar and Swiss cheese during ripening, *J. Food Sci.*, **59**, 1994, 1309.

THE CHARACTERISTICS OF VOLATILE COMPOUNDS ISOLATED FROM RYE FLOUR LEAVEN

S u m m a r y

The purpose of this paper was to characterize compounds from rye flour leaven, which is used for making prepare sour soup.

It was found that for full characteristics of flavour compounds various isolation methods should be applied. The volatiles were isolated after 1, 2 and 3 days of spontaneous fermentation by using simultaneous steam distillation and extraction technique, static and also dynamic headspace techniques. Gas chromatography analyses were performed on capillary column of different polarities connected to flame ionization detector, electron capture detector, mass spectrometer and sniffing port. The organic acids were analyzed by high performance chromatography on HPX – 87H column and Dual Adsorbance Detector.

Totally 26 compounds were identified: 6 acids, 7 alcohols, 4 aldehydes, 5 esters, 2 ketones, 1 hydrocarbon, 1 heterocyclic compound. ❖

MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, WIESŁAW KOPEĆ

IZOLACJA CYSTATYNY Z BIAŁKA JAJA Z ZASTOSOWANIEM FILTRACJI MEMBRANOWEJ I CHROMATOGRAFII POWINOWACTWA

Streszczenie

Podobieństwa budowy i właściwości biologicznych cystatyny białka jaja kurzego do ludzkiej cystatyny c stwarzają możliwość jej wykorzystania w prewencji i leczeniu wielu chorób. Dlatego celem badań było opracowanie podstaw procesów izolacji i oczyszczania cystatyny białka jaja przy użyciu techniki filtracji membranowej i chromatografii powinowactwa. W wyniku diafiltracji odzyskiwano z białka jaja lub jego roztworów, po usunięciu z nich lizozymu, 40-65% aktywnego inhibitora. Wykazano, że usunięcie lizozymu z roztworu białka nie wpływa na ilość odzyskanej cystatyny w filtratach. Natomiast w procesach oczyszczania cystatyny metodą chromatografii powinowactwa odzyskiwano do 50% inhibitora zawartego w preparatach uzyskanych po suszeniu rozpyłowym roztworów białek; ilości te były niższe o 3-4% jeśli oczyszczano preparaty białka z którego usunięto lizozym.

Wstęp

Surowce żywnościowe są bogatym źródłem substancji biologicznie czynnych tj. enzymów i ich inhibitorów, witamin i prowitamin, steroli i in. Dużo tych związków zawiera jajo kurze, a szczególnie jego część białkowa bogata m.in. w lizozym, enzym o silnych właściwościach bakteriobójczych, który jest pozyskiwany z tego surowca i wykorzystywany na szeroką skalę zarówno w przemyśle spożywczym, jak i w medycynie [8]. Białko jaja zawiera także owomucynę, która stanowi bogate źródło kwasu sialowego czy owomukoid wykazujący silne właściwości inhibicji enzymów proteolitycznych [3]. Mniej znanym biologicznie aktywnym składnikiem białka jaja jest cystatyna, będąca inhibitorem proteaz cysteinowych. Występuje w białku jaja kurzego jako mieszanina dwóch głównych izoelektrycznych form o identycznej sekwencji aminokwasowej (obie formy zawierają po 116 aminokwasów) i masie molekularnej 12700

Mgr inż. M. Korzeniowska, dr hab. inż. W. Kopeć, Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych, Akademia Rolnicza we Wrocławiu, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław.

Da: formy A nieufosforylowanej o pI = 6,5 oraz formy B ufosforylowanej o pI=5,6 [2, 9]. Cystatyna białka jaja kurzego jest silnym inhibitorem papainy i ficyny oraz katepsyn B, H, L i peptydaz papaino-podobnych [1]. Białko to charakteryzujące się wysoką stabilnością zarówno w ekstremalnych warunkach pH (pH około 12,0), jak i temperatury (-20°C i 115°C przez 15 min nie powoduje spadku aktywności inhibicyjnej) [5, 10]. Według klasyfikacji Rawlingsa i Barretta [6] należy ona wraz z ludzką cystatyną c do drugiej podrodziny cystatyn; oba inhibitory wykazują wysoki stopień podobieństwa, wyrażający się zbliżoną masą molekularną, strukturą trzeciorzędową, sekwencją aminokwasową oraz sposobem inhibicji enzymów. Dlatego też cystatyna izolowana z białka jaja kurzego może być stosowana w leczeniu wielu chorób, m.in.: chorób nowotworowych, choroby Alzheimera, czy schorzeń przyzębia [4, 7]. Istotnym ograniczeniem w pozyskiwaniu inhibitora z białka jaja jest jego niska zawartość wynosząca 0,05% oraz duża lepkość białka jaja utrudniająca proces chromatografii powinowactwa z wykorzystaniem papainy, który jest podstawową metodą wykorzystywaną do oczyszczania cystatyny. W związku z tym procesy izolowania i oczyszczania cystatyny są łatwiejsze do przeprowadzenia, jeśli stosuje się rozcieńczone roztwory białka, bądź frakcje białek jaja uzyskiwane m.in. w procesach izolacji lizozymu prowadzonych z wykorzystaniem technik chromatograficznych i separacji membranowej. Proces pozyskiwania cystatyny jest wówczas dwustopniowy; w pierwszym etapie wydziela się filtrat białkowy wzbogacony w inhibitor (przy wykorzystaniu technik membranowych), w drugim prowadzi się oczyszczanie inhibitora techniką chromatografii powinowactwa, dlatego też celem przeprowadzonych badań było opracowanie podstaw procesów izolacji i oczyszczania cystatyny białka jaja przy użyciu wspomnianych technik separacji.

Materiał i metody badań

Całość doświadczenia, podobnie jak proces izolacji cystatyny z białka jaja i jej oczyszczania, podzielono na dwa etapy. W etapie pierwszym pozyskiwano filtry białek jaja wzbogacone w cystatynę metodami separacji membranowej. Materiałem do badań było białko jaja, oddzielone od żółtka metodą przemysłową (Ovopol, Nowa Sól), o pH w granicach 8,5–9,0, które poddawano procesowi mikrofiltracji (diafiltracji) na filtrach kapilarnych polipropylenowych o rzeczywistym punkcie "odcięcia" wyznaczonym w stosunku do białek jaja na poziomie 30 kDa (w warunkach filtracji niskociśnieniowej rzędu ok. $1-2 \cdot 10^3$ kPa) przy rozcieńczeniu wodą w stosunku od 1:2 do 1:6. Przeprowadzono również diafiltrację roztworów białka jaja (rozcieńczonych w stosunku 1:4) po izolacji z nich lizozymu metodą chromatografii jonowymiennej w warunkach przemysłowych (Ovopol, Nowa Sól). Filtry uzyskane w wyniku separacji na filtrach kapilarnych polipropylenowych zagęszczano na filtrach membranowych polisulfonowych o nominalnym punkcie "odcięcia" 10 kDa, a następnie suszono rozpyło-

wo uzyskując dwa rodzaje preparatów wzbogaconych w cystatynę; pierwszy z białka jaja i drugi z białka jaja – z którego usunięto lizozym.

W drugim etapie badań preparaty białka jaja wzbogacone w cystatynę, po uprzedniej rehydratacji wodą w stosunku 1:8, oczyszczano techniką chromatografii powinowactwa według Siewińskiego i wsp. [7]. W tym celu roztwory preparatów nanoszono na złożę kolumny chromatograficznej Sepharose 4B z immobilizowaną papainą, gdzie następowało wiązanie cystatyny tzw. wolnej, tzn. nieskompleksowanej z innymi białkami. Po przejściu roztworu białka przez złożę kolumny (tzw. kolumna I) przemywano 200 cm³ wody destylowanej, a następnie 50 cm³ 2% roztworem NaCl w celu usunięcia białek zanieczyszczających preparat. Inhibitor odzyskiwano ze złoża kolumny poprzez przeprowadzenie obróbki chemiczno-termicznej wykorzystującej bardzo wysoką oporność cystatyny na działania termiczne i zmiany pH. Obróbka ta polegała na doprowadzeniu pH zawiesiny złoża ze związanym białkiem do wartości 12,0 przy użyciu 0,1 M NaOH, ogrzaniu w 100°C przez 3 min, schłodzeniu do 2–4°C i utrzymaniu tej temperatury przez 24 godziny, następnie zmianie pH do wartości 6,0–7,0 przy użyciu 0,1 N HCl i odwirowaniu roztworu zawierającego oczyszczoną cystatynę od złoża. Roztwór białek uzyskany po przejściu przez kolumnę chromatograficzną zawierający kompleksy cystatyny z innymi białkami poddawano takiej samej obróbce chemiczno-termicznej, jak w przypadku złoża, w celu rozłożenia kompleksów, doprowadzenia do denaturacji innych niż cystatyna białek i ich usunięciu z roztworu w wyniku wirowania. Tak przygotowany roztwór nanoszono na złożę drugiej kolumny chromatograficznej (tzw. II kolumna) i powtarzano całość procedury przemywania i odzyskiwania inhibitora ze złoża.

Zdolność (aktywność) inhibicyjną cystatyny oznaczano w roztworach odzyskanych ze złoża kolumny po obróbce chemiczno-termicznej, a także w roztworach uzyskanych po przejściu przez kolumnę oraz roztworach przemywających tj. wodzie i 2% roztworze NaCl metodą pośrednią poprzez określenie zdolności hamowania aktywności papainy wobec substratu syntetycznego BANA [7]. Jednostka aktywności cystatyny stosowana w badaniach własnych oznacza zdolność inhibowania przez 100 mg cystatyny takiej ilości papainy, która hydrolizuje 1,0 mM substratu syntetycznego BANA na minutę w warunkach standardowych (37°C). Odzysk inhibitora został wyliczony jako stosunek aktywności oczyszczonego inhibitora [jedn. akt.] do aktywności inhibitora w roztworze wyjściowym [jedn. akt.], przeliczony na objętość roztworów oraz wyrażony w procentach.

Omówienie wyników

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że w przeprowadzonych procesach membranowych tj. mikrofiltracji i diafiltracji odzyskiwano od około 10% do 65% aktywnej cystatyny zawartej w wyjściowym białku jaja, przy czym najkorzystniej wy-

padła diafiltracja roztworów białka rozcieńczonych wodą w stosunku 1:4, dla której odzysk aktywnego inhibitora w filtracji wynosił 64,4% a po zagęszczaniu i suszeniu 50,4% (tab. 1). Po diafiltracji roztworów białka o stosunku rozcieńczenia 1:6 uzyskano odzysk cystatyny wynoszący 47,6%, który nie różni się statystycznie od wartości uzyskanej w procesie, w którym filtrowano białko rozcieńczone w stosunku 1:4. Tak więc stosowanie wyższych rozcieńczeń (1:6) jest nieuzasadnione. Stwierdzono również, że odzysk cystatyny z roztworów białka jaja, z których uprzednio wydzielono lizozym, kształtuje się na poziomie zbliżonym do odzysku inhibitora z roztworów białka nie

Tabela 1

Separacja membranowa roztworów białka jaja.
Membrane separation of egg white solutions.

Zawartość aktywnej cystatyny Content of active cystatin	Mikrofiltracja Microfiltration	Diafiltracja 1:2 Diafiltration 1:2	Diafiltracja 1:4 Diafiltration 1:4	Diafiltracja 1:6 Diafiltration 1:6	Diafiltracja po adsorpcji lizozymu 1:4 Diafiltration after lysozyme removal 1:4
Zawartość aktywnej Cystatyny w filtracie w stosunku do zawartości wyjściowej (%) Quantity of active cystatin in filtrates in relation to initial amount (%)	9,4 a	41,8 b	64,4 c	65,0 c	64,0 c
Zawartość aktywnej cystatyny w preparatach po zagęszczaniu i suszeniu w stosunku do zawartości wyjściowej (%) Quantity of active cystatin in preparates after concentration and drying in relation to initial amount (%)	6,8 a	30,0 b	50,4 c	47,6 c	52,1 c

a, b, c, d wystąpienie wspólnej litery w indeksach wartości średnich w jednym wierszu wskazuje na brak różnic statystycznych przy $P \geq 0,95$.

The same letter in lineans indices in row shows lack of significant difference at $P \geq 0,95$.

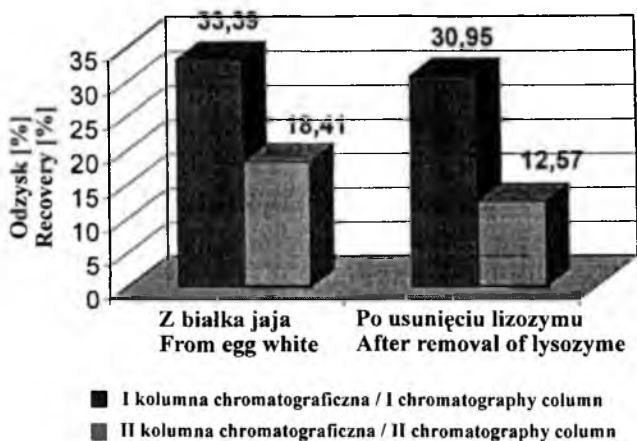
poddanego procesowi chromatografii jonowymiennej w celu adsorpcji lizozymu i wynosi 52,1%. Najniższe wartości (6,8%) odzysku inhibitora w filtracji uzyskano po procesie mikrofiltracji nierozcieńczonego białka jaja, co wyklucza tę metodę jako możliwą do zastosowania w warunkach przemysłowych.

Do oczyszczania cystatyny zawartej w suszonych preparatach białka jaja wzbogaconych w ten inhibitor (po ich uprzedniej rehydratacji) zastosowano metodę chromatografii powinowactwa inhibitora tj. cystatyny do enzymu – papainy. Ilości oczyszczonej cystatyny odzyskanej bezpośrednio w formie inhibitora niezwiązanego (I kolumna) oraz inhibitora wydzielonego z kompleksów białkowych (II kolumna) przedstawiono na rys. 1. W efekcie przeprowadzonego procesu ze złoża pierwszej kolumny chromatograficznej odzyskiwano około 33,39% aktywnej cystatyny w odniesieniu do ilości inhibitora w wyjściowych suszonych preparatach wzbogaconych w cystatynę, dla białka o pełnym składzie protein oraz około 30,95% dla białka po izolacji lizozymu. Na złożu kolumny chromatograficznej II adsorbowano cystatynę z roztworów po rozłożeniu kompleksów białkowych odzyskując 18,41% wyjściowej ilości aktywnego inhibitora dla roztworów białka nie poddanego procesowi adsorpcji lizozymu i 12,57% dla roztworów po izolacji lizozymu. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że z roztworów, z których usunięto uprzednio lizozym, uzyskuje się o 3–4% mniej oczyszczonej cystatyny. Łącznie z preparatów białka jaja wzbogaconych w cystatynę odzyskiwano około 44–52% aktywnego inhibitora z uwzględnieniem strat w procesie rehydratacji. Siewiński i wsp. [7] w swoich badaniach uzyskiwali wyższą ilość oczyszczonej cystatyny tj. około 70% w stosunku do ilości wyjściowej, stosując podobną procedurę analityczną. Jednakże rozdział i oczyszczanie cystatyny prowadzono z natywnego białka jaja (bez zagęszczania i suszenia), co zapewne wpływało na lepszą wydajność procesu.

Generalnie stosunkowo niskie wydajności procesu oczyszczania cystatyny białka jaja, z wykorzystaniem chromatografii powinowactwa, wynikają z dużego udziału kompleksów inhibitora w roztworach i związanej z tym konieczności prowadzenia procesu co najmniej dwustopniowego.

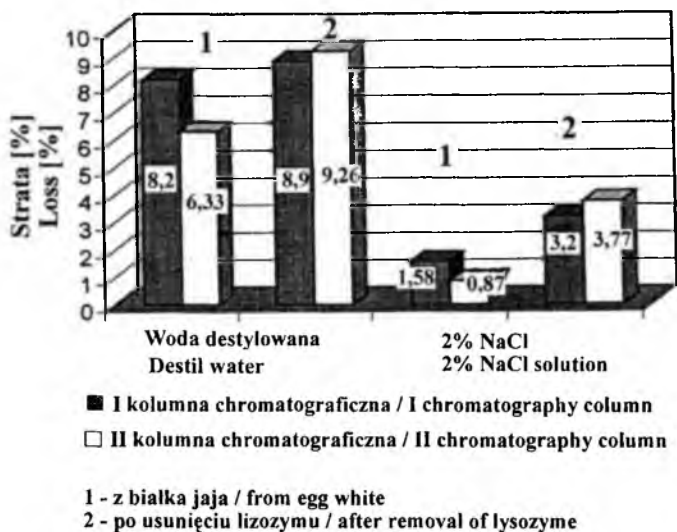
Na rys. 2. przedstawiono straty cystatyny w roztworach użytych do przemywania złoża kolumny chromatograficznej (I i II kolumny), tj. wodzie destylowanej i 2% NaCl oraz w roztworze uzyskanym po przejściu rozcieńczonego preparatu wzbogaconego w cystatynę przez pierwszą oraz drugą kolumnę. W wodzie destylowanej użytej do przemywania pierwszej kolumny chromatograficznej zanotowano od 8,20% do 8,90% wyjściowej ilości aktywnego inhibitora, natomiast w przypadku drugiej kolumny wykazano 6,33–9,26% aktywności cystatyny; przy czym wyższe wartości odnoszą się do preparatów białka z usuniętym lizozymem. Podobna zależność występowała w odniesieniu do strat cystatyny w 2% roztworach NaCl użytych do przemywania złożeń kolumn chromatograficznych. W wyniku przemywania pierwszej kolumny tracono od 1,58%

do 3,20% aktywnej cystatyny, a w przypadku drugiej kolumny od 0,87% do 3,77% inhibitora.



Rys. 1. Odzysk cystatyny w procesie chromatografii powinowactwa w zależności od rodzaju oczyszczanego preparatu.

Fig. 1. Cystatin recovery in affinity chromatography process according to the kind of purified preparation.



Rys. 2. Straty aktywnej cystatyny w trakcie przemywania kolumny chromatograficznej w zależności od rodzaju oczyszczanego preparatu.

Fig. 2. Loss of active cystatin in washing processes of affinity chromatography column according to the kind of washing solution.

Wnioski

1. W wyniku diafiltracji białka jaja rozcieńczonego wodą odzyskiwano w filtracie od 40% do 65% aktywnego inhibitora; zwiększanie rozcieńczenia białka jaja powyżej wartości 1:4 nie wpłynęło na wzrost ilości aktywnej cystatyny.
2. W procesie chromatografii powinowactwa odzyskiwano do 50% cystatyny zawartej w preparatach białka jaja wzbogaconych w inhibitor, z czego około 33% stanowiła cystatyna w formie niezwiązanej.
3. Z preparatów wytworzonych z białka, z którego uprzednio usunięto lizozym, odzyskiwano o 3–4% mniejsze ilości aktywnej cystatyny niż z preparatów wytworzonych z białka jaja nie poddanego procesowi adsorpcji.

Literatura

- [1] Barrett A.J., Anastasi A., Brown M.A., Kembhavi A.A., Nicklin M.J.H., Sayers Ch.A. Sunter D.C.: Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteinases - improved purification from egg white, characterization, and detection in chicken serum - *Biochem. J.*, **211**, 1983, 129.
- [2] Bode W., Engh R., Musil D., Thiele U., Huber R., Karshikov A., Brzin J., Kos J., Turk V.: The 2,0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J.*, **7**, **8**, 1988, 2593.
- [3] Henskens Y.M.C., Veerman E.C.I., Nieuw Amerongen A.V.: Cystatins in health and disease. *Biol. Chem.*, **377**, 1996, 71.
- [4] Jerala R., Żerownik E., Lohner K., Turk V.: Structural basis for the difference in thermodynamic properties between the two cysteine proteinase inhibitors human stefins A and B. - *Prot. Eng.*, **7**, 1994, 977.
- [5] Rawlings N.D., Barrett A.J.: Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *J. Mol. Evol.*, **30**, 1990, 60.
- [6] Siewiński M.: Method of purification of thiol proteinase inhibitors from human urine. *Cancer Biochem. Biophys.*, **12**, 1991, 33.
- [7] Ternes W.: *Naturwissenschaftliche Grundlagen der Lebensmittelzubereitung*. Behr's Verlag, Hamburg 1990, 43.
- [8] Trziszka T., Kopeć W.: Lizozym fenomenalny składnik jaja. *Drobiarstwo* 1996, 43.
- [9] Turk V., Brzin J., Longer M., Ritonja A., Eropkin M., Borchart U., Machleidt W.: Protein inhibitors of cysteine proteinases III. Amino-acid sequence of cystatin from chicken egg white. *Z. Physiol. Chem.*, **364**, 1983, 1487.
- [10] Żerownik E., Cimerman N., Kos J., Turk V., Lohner K.: Thermal denaturation of human cystatin c and two of its variants; comparison to chicken cystatin. *Biol. Chem.*, **378**, 1997, 1199.

CYSTATIN ISOLATION FROM EGG WHITE USING MEMBRANE FILTRATION AND AFFINITY CHROMATOGRAPHY

S u m m a r y

The similarity of structure and biological properties of hen's cystatin and human cystatin c gives the possibility for application of egg cystatin in therapy and prevention of many illness. In the studies basic processes for isolation and purification of cystatin from hen's egg using membrane filtration and affinity chromatography have been worked out. As the effect of diafiltration 40-65% active inhibitor was recovered from egg white or egg white solutions after lysozyme removal. It was found that quantity of active cystatin is not lowered if lysozyme was removed from egg white. Purification of cystatin with affinity chromatography led to 50% recovery of inhibitor from preparations obtained after spray drying of protein solutions. The amount of purified inhibitor was 3-4% lowered for preparations made from egg white after lysozyme removal. ✕

AGNIESZKA GŁOWACKA, TADEUSZ ANTCZAK,
KATARZYNA KOŁUCKA, TADEUSZ TRZMIEL

ENZYMATYCZNA SYNTEZA ESTRU ETYLOWEGO N-ACETYLO-L-TYROZYNY W ORGANICZNYCH MEDIACH

Streszczenie

Badano estryfikację N-acetylo-L-tyrozyny katalizowaną przez natywną oraz immobilizowaną na szkle alkalostabilną proteinazę szczepu *B.alcalophilus* PB92 w środowisku etanolu. Zaobserwowano, że natywna proteinaza katalizowała syntezę estru etylowego N-Ac-L-Tyr (ATEE) w środowisku zawierającym 6% wody, z prędkością początkową $2,5 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol min}^{-1}$. Natomiast immobilizowana proteinaza wykazywała wyższą aktywność i stabilność w porównaniu z jej natywną formą. Badano również aktywność katalityczną natywnej proteinazy w układach kosolwentów (stężenie wody 6%): etanol - aceton// - acetonitryl// -DMF w stosunku 1:1 (v/v). Nie zaobserwowano syntezy ATEE w obecności acetonu i DMF-u.

Wstęp

Już w 1908 roku Ikeda odkrył i potwierdził, na przykładzie soli monosodowej kwasu L-glutaminowego (MSG), duże znaczenie aminokwasów w kreowaniu smaku produktów żywnościowych. MSG był głównym komponentem dodatków smakowych tradycyjnej japońskiej żywności pochodzącej z morza. Dzisiaj aminokwasy stosowane w przetwórstwie żywności (*food processing*), nie tylko wzmacniają jej walory odżywcze, ale również udoskonalają naturalny smak. Dużą rolę jako dodatki smakowe pełnią dipeptydy, czego przykładem jest aspartam (AspPheOMe). Obecnie produkowany na skalę przemysłową jest cenionym substytutem sacharozy. W zależności od składu aminokwasowego dipeptydy mogą charakteryzować się smakiem słodkim, słonym, gorzkim oraz kwaśnym [8]. W ostatnich latach dipeptydy otrzymuje się na drodze enzymatycznej syntezy, wykorzystując m.in. enzymy proteolityczne, np.: termolizynę,

α -chymotrypsynę, subtilizynę. Procesy te prowadzi się w układach różnych solwentów o niskiej zawartości wody [17].

W ciągu ostatniej dekady „enzymologia niewodna” wyłoniła się jako jeden z głównych obszarów badań biotechnologicznych. Postęp jaki osiągnięto w tej dziedzinie doprowadził do pojawienia się wielu interesujących możliwości praktycznego zastosowania enzymów w środowisku rozpuszczalników organicznych. Środowisko bardziej lub mniej polarne jest tylko pozornie nietypowe dla katalizy enzymatycznej, ponieważ znaczna część enzymów *in vivo* jest zasocjowana ze strukturami błon komórkowych lub cytoplazmatycznych [13].

Zastosowanie biokatalizatorów (enzymów, organelli komórkowych, całych komórek lub fragmentów tkanek) w środowisku organicznym o obniżonej zawartości wody posiada kilka istotnych zalet:

- umożliwia przesunięcie równowagi termodynamicznej w kierunku reakcji syntezy (w przypadku stosowania enzymów hydrolitycznych),
- wzrasta rozpuszczalność hydrofobowych reagentów,
- ułatwia odzysk produktu i biokatalizatora,
- zmniejsza ryzyko zakażeń mikrobiologicznych,
- stabilizuje biokatalizator [1, 6, 7].

Enzymy w układach organicznych są zdolne katalizować procesy, które praktycznie nie przebiegają w roztworach wodnych, np. enzymy proteolityczne uczestniczą w reakcjach transestryfikacji, estryfikacji, syntezy peptydów i amidów, których równowaga termodynamiczna w wodzie jest przesunięta na korzyść hydrolizy [9, 10, 17]. Jednakże, ich aktywność katalityczna jest niższa w środowisku solwentów nawet o kilka rzędów wielkości porównując z tą, jaką posiadają w środowisku wodnym. Badania Klibanova i wsp. [3, 12, 19] wykazały, iż α -chymotrypsyna i subtilizyna w oktanie oraz wielu innych rozpuszczalnikach są o ok. 10^5 mniej aktywne. Obniżenie reaktywności enzymu uznaje się za główną wadę enzymatycznej katalizy w układach organicznych i jest to jeden z powodów uniemożliwiających jej aplikację na większą skalę.

Struktura cząsteczki białka w roztworze wodnym zależy od skomplikowanej sieci wiązań wodorowych oraz elektrostatycznych i hydrofobowych interakcji; są one ważnym czynnikiem determinującym katalitycznie aktywną konformację cząsteczki enzymu. Generalnie rozpuszczalniki nie posiadają zdolności tworzenia wiązań wodorowych i z powodu niskich stałych dielektrycznych prowadzą do silnych oddziaływań elektrostatycznych usztywniających strukturę białka [12]. Według badań Laane'a [15], aktywność katalityczna enzymów w takich warunkach jest efektem ich zdolności do silnego wiązania „wody niezbędnej” (*essential water layer*), tworzącej tzw. płaszcz hydratacyjny budowany przez kilka warstw cząsteczek wody przylegających bezpośrednio do powierzchni cząsteczki białka, który zachowują nawet wtedy, gdy są zawieszony w niewodnym rozpuszczalniku. Obok konformacyjnych zmian enzymu i redukcji

jego „giętkości”, istnieje szereg innych czynników fizykochemicznych, takich jak, ograniczenia dyfuzyjne, blokowanie centrum aktywnego, problem związany z pH, destabilizacja stanu tranzycji, które powodują obniżenie enzymatycznej aktywności w organicznych solwentach.[3, 12]. Aby zminimalizować wpływ tych czynników stosuje się szereg metod. Jedną z nich jest immobilizacja enzymu. Unieruchamianie enzymów jest doskonałą metodą ich stabilizacji w obecności różnych rozpuszczalników, a ponadto pociąga za sobą wzrost trwałości termicznej i odporności na denaturację białka enzymatycznego. W celu zachowania właściwości katalitycznych enzymów w systemach hydro-organicznych, przy wysokich stężeniach składników organicznych, konieczne jest utrwalenie ich aktywnej konformacji. Ponadto, reakcje katalizowane immobilizowanymi enzymami są łatwiejsze do kontroli i automatyzacji [7].

W artykule prezentujemy wyniki badań nad syntezą estru etylowego N-acetylo-L-tyrozyny (ATEE) katalizowaną przez alkalostabilną proteinazę szczepu *B. alcalophilus* PB92. Obejmują one również eksperymenty nad określeniem wpływu rozpuszczalników hydrofilowych, tj. acetonu, acetonitrylu i N,N-dimetyloformamidu (DMF) na syntezę ATEE, którą przyjęto za układ modelowy.

Materiały i metody badań

Serynowa proteinaza alkalostabilna PB92 (EC 3.4.21.62) szczepu *B. alcalophilus* PB92 [18] (preparat handlowy Maxacal) o aktywności właściwej 12 mJ A/mg białka (1 mg preparatu zawiera 0,045 mg białka). N-acetylo-L-tyrozyna (AT) i ester etylowy N-acetylo-L-tyrozyny (ATEE) firmy Sigma. Rozpuszczalniki organiczne czda., firmy POCH, osuszone sitem molekularnym 4Å. Szkło porowate Cormay (Lublin), zestaw do ultrafiltracji (Aldrich, Amicon).

Metody analityczne

Aktywność proteolityczną enzymu oznaczono metodą Ansona [4], stosując jako substrat zdenaturowaną mocznikiem hemoglobinę wołową.

Za jednostkę aktywności proteolitycznej Ansona [jA] przyjęto tę ilość enzymu, która w warunkach standardowych testu (6 cm³ inkubatu, 100 mg hemoglobiny, temperatura 25°C) hydrolizuje zdenaturowaną hemoglobinę z taką szybkością początkową, że ilość rozpuszczonego w 5% kwasie trichlorooctowym produktu hydrolizy powstająca w czasie 1 minuty, daje po reakcji z odczynnikiem Folina wartość absorbancji odpowiadającą 1mmolowi tyrozyny.

Białko oznaczono metodą Lowry'ego [16].

Stałą Michaelisa-Menten określono w reakcji dla AT w następujących warunkach: stężenia substratu 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 17,5 mM, zawartość wody w układzie

reakcyjnym 6%, temperatura 30°C. Wartości K_M i V_{max} wyznaczono z wykresu Lineweavera-Burka.

Produkty reakcji estryfikacji analizowano metodą HPLC (chromatograf Gold Beckman wyposażony w detektor UV-Vis model 166). Próbkę mieszaniny reakcyjnej o objętości $V = 50 \mu\text{l}$, z której białko usunięto metodą ultrafiltracji (membrany PTFE oraz YM), nastrzykiwano bezpośrednio na kolumnę ODS (250×4,6 mm) i eluowano z szybkością $1 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ w temp. 25°C mieszaniną woda/acetonytryl w stosunku 1:1 (v/v). Otrzymany produkt (ATEE) oraz nie przereagowany substrat (AT) monitorowano przy długości fali $\lambda = 280 \text{ nm}$ (rys. 2).

Immobilizacja enzymu na szkle porowatym metodą diizocyjanianową [2]

1 g nośnika (szkła porowatego posiadającego wolne grupy -OH, $dp = 200\text{--}315 \mu\text{m}$, $D = 63,2 \text{ nm}$) zawieszono w 50 cm^3 acetonu. Następnie dodano po 2 cm^3 trietyloaminy i heksametylenodiizocyjanianu. Mieszaninę reakcyjną pozostawiono na 45 min w temperaturze pokojowej. Następnie nośnik przemyto acetonem i wodą. Do 3 g uaktywnionego, wilgotnego nośnika dodano $12,5 \text{ cm}^3$ roztworu proteinyazy o stężeniu $20 \text{ mg preparatu cm}^{-3}$ i całość inkubowano w temperaturze 4°C w ciągu 16–18 godzin, mieszając. Immobilizowany na szkle enzym oddzielono od roztworu, przemyto kilkoma porcjami 0,1% roztworu octanu wapnia i pozostawiono do wysuszenia w temperaturze pokojowej na 24 godziny.

Enzymatyczna synteza estru etylowego N-Ac-L-Tyr

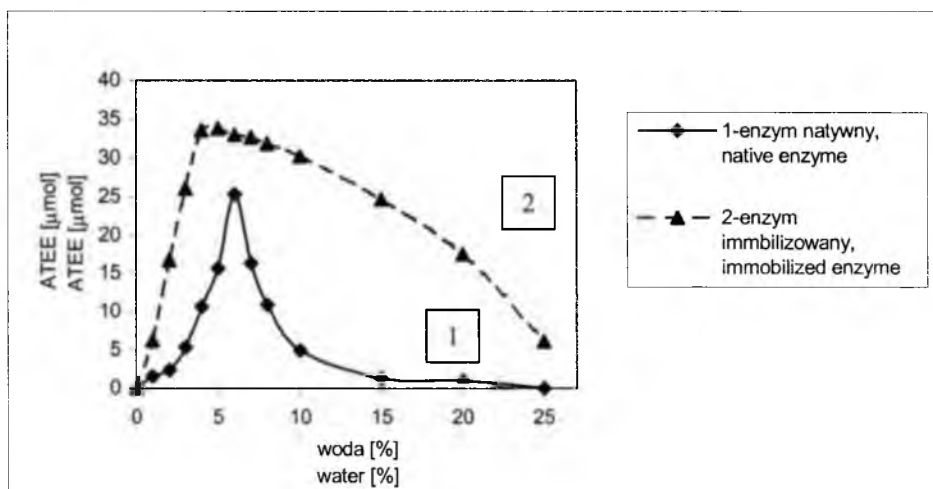
Syntezę prowadzono w szczelnie zamkniętych naczyniach zawierających mieszaninę N-Ac-L-Tyr (2,5–17,5 mM), alkoholu etylowego – stanowiącego jednocześnie substrat oraz środowisko reakcji ($V = 5 \text{ cm}^3$) – i wody (0–25%). Sprawdzano również warianty: etanol-rozpuszczalnik hydrofilowy (aceton, acetonytryl, DMF) w stosunku 1:1 (v/v) z dodatkiem 6% wody. Enzym stosowano w formie preparatu handlowego (22 mg preparatu zawierało 1 mg białka) lub w formie preparatu immobilizowanego na szkle porowatym (30 mg preparatu zawierało ok. 0,7 mg białka). Mieszaninę reakcyjną intensywnie wstrząsano w temperaturze 30°C.

Wyniki i dyskusja

Wpływ zawartości wody na syntezę ATEE

Podczas przemian katalizowanych przez proteinyazy w środowisku niewodnym woda stanowi zarówno element środowiska, jak i jeden z produktów reakcji, a jej znaczenie w katalizie należy uznać za kluczowe. W środowisku rozpuszczalników organicznych wpływa ona nie tylko na wartość stałej równowagi reakcji, ale wysycając

hydrofilowe regiony białka utrzymuje również jego katalityczną konformację. Rys. 1. prezentuje przebieg syntezy ATEE katalizowanej przez wolną oraz immobilizowaną alkalostabilną proteinazę w funkcji stężenia wody w środowisku reakcji. W warunkach, gdzie zawartość wody nie przekraczała 0,5% nie zaobserwowano wyraźnego przyrostu produktu. Enzym w obu formach natywnej i immobilizowanej wykazywał niewielką aktywność katalityczną. Stężenie powstałego produktu było tak małe, że wyniki analizy HPLC mieściły się w granicach błędów. Wraz ze wzrostem zawartości wody, w układzie gwałtownie wzrastała szybkość estryfikacji AT. Reakcja z udziałem natywnej proteinazy przebiegała najszybciej w przedziale stężeń wody od 5 do 7%, osiągając największą szybkość początkową, $2,5 \cdot 10^{-2} \mu\text{moli} \cdot \text{min}^{-1}$, w środowisku zawierającym 6% wody. W tym przedziale zmiany zawartości wody w środowisku reakcji o $\pm 2\%$ w sposób znaczący wpływają na efekty syntezy ATEE przez tę formę enzymu. Zarówno obniżenie, jak i wzrost zawartości wody w układzie, poza optymalny zakres (dla każdej formy stosowanego preparatu), powodował stopniowe hamowanie reakcji i spadek ilości syntetyzowanego estru. W obu przypadkach mamy z pewnością do czynienia ze zmianami konformacyjnymi zachodzącymi w białku proteinazy, generowanymi zmianami środowiska reakcji. Przy wysokich stężeniach wody przebiegają



AT (0,011 g; 0,05 mmol), woda 6%, EtOH 5 cm³, natywny enzym (1 mg białka), immobilizowany preparat 30 mg (0,7 mg białka), temp. 30°C, pomiar po czasie t = 12h.

AT (0,011 g; 0,05 mmol), woda 6%, EtOH 5 cm³, native enzyme (1 mg of protein), immobilized preparation 30 mg (0,7 mg of protein), temp. 30°C, measurement after 12 h.

Rys. 1. Wpływ zawartości wody na synteze ATEE katalizowaną przez natywną oraz immobilizowaną proteinazę alkalostabilną.

Fig. 1. Influence of water content on synthesis of ATEE catalysed by native and immobilized high-alkaline proteinase.

dotatkowo: reakcja rewersji oraz proces autolizy proteiny [6]. Immobilizacja enzymu na nośniku może zmniejszyć problem autolizy. Wyniki badań wskazują, że unieruchomiona na szkle alkalostabilna proteinaza katalizuje proces estryfikacji AT z większą wydajnością niż enzym nie immobilizowany – szczególnie przy większej zawartości wody w środowisku reakcji. Immobilizacja umożliwia zatem utrwalenie katalitycznie aktywnej konformacji enzymu i w ten sposób czyni go mniej wrażliwym na zmiany środowiska reakcji. Również charakter samego nośnika (hydrofilowy, z wysokim ujemnym ładunkiem elektrostatycznym) może kształtować mikrośrodowisko w bezpośrednim sąsiedztwie cząsteczek białka immobilizowanego biokatalizatora. W przypadku immobilizowanej proteiny zjawisko to wyjaśnia obserwowane przesunięcie wydajności syntezy ATEE w kierunku niższych stężeń wody (4%). Kształt krzywej 2. na rys. 1. wskazuje na większą tolerancję immobilizowanej proteiny na wzrost zawartości wody w układzie reakcyjnym. Preparat ten katalizuje estryfikację AT w środowisku etanolu zawierającym nawet 25% wody.

Wpływ środowiska reakcji (rozpuszczalnika) na syntezę ATEE

Badano estryfikację AT w układach kosolwentów: EtOH - acetonitryl// -aceton// -DMF w porównaniu z tym procesem w środowisku samego etanolu (tab. 1). Woda w każdym układzie stanowiła 6%. W badaniach stosowano natywny preparat proteiny. W środowisku etanolu reakcja przebiegała z najwyższą szybkością początkową równą $2,5 \times 10^{-2} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$. Po 48 godzinnej reakcji uzyskano wydajność przereagowania AT 96%. Układ EtOH-acetonitryl tworzy mniej korzystne warunki działania enzymu w porównaniu ze środowiskiem samego etanolu. Wyznaczone stałe Michaelisa wskazują na dwukrotne obniżenie powinowactwa proteiny do AT, gdy połowę objętości EtOH zastąpiono acetonitrylem. Uzyskane rezultaty wskazują na wybitnie niekorzystny wpływ acetonu i dimetyloformamidu na przebieg syntezy ATEE. W układach etanolu z tymi rozpuszczalnikami otrzymano śladowe ilości produktu.

Być może ilość wody optymalna dla środowiska czystego etanolu jest niekorzystna dla badanych układów kosolwentów. Laane i współpracownicy [11] zaproponowali pewien model oparty na ilościowej zależności fizykochemicznych właściwości indywidualnych rozpuszczalników, a aktywnością biokatalizatorów. W modelu tym miernikiem polarności-hydrofobowości jest wartość $\log P$, którą dla rozpuszczalników organicznych wylicza się z cząstkowych stałych hydrofobowych. Jeżeli rozpuszczalniki charakteryzują się wartościami $\log P > 4$ (apolarne), nie niszczą warstwy wody niezbędnej enzymu. Rozpuszczalniki z $\log P$ o wartościach poniżej 2 (polarne) są niekorzystne dla biokatalizy, ponieważ silnie oddziałują na płaszczyznę hydratacyjną. Mają one zdolność do „odrywania” warstwy wody niezbędnej stabilizującej biokatalizator, prowadząc w ten sposób do jego inaktywacji lub denaturacji. Czynnikiem zabezpieczającym enzym przed tego typu działaniami jest woda zawarta w środowisku reakcji.

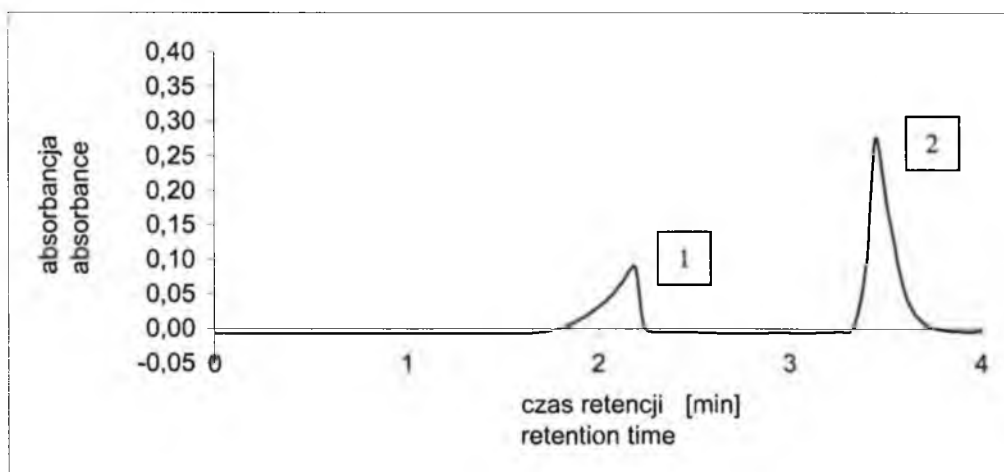
W przypadku rozpuszczalników hydrofilowych stężenie wody w środowisku musi być wyższe w porównaniu z rozpuszczalnikami apolarnymi [19]. Dlatego też należałoby zoptymalizować zawartość wody lub aktywność wody [5] dla każdej mieszaniny rozpuszczalników. W kolejnym etapie badań planuje się kontynuację tych eksperymentów z udziałem immobilizowanej proteiny.

Tabela 1

Wpływ rozpuszczalników na syntezę ATEE.
Influence of solvents on ATEE synthesis.

Rozpuszczalnik Solvent	Szybkość początkowa Initial rate [$\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$]	K_M [mM]	Log P	Wydajność ATEE ATEE Yield [%]	
				24h	48h
Etanol Ethanol	$2,5\cdot 10^{-2}$	1,1	-0,24	70	96
Etanol-Acetonitryl Ethanol-Acetonitrile	$1,64\cdot 10^{-2}$	2,4	-0,33	42	74
Etanol-Aceton Ethanol-Acetone	0	–	-0,23	0	–
Etanol-DMF Ethanol-DMF	0	–	-1,0	0	–

AT (0,011 g; 0,05 mmol), woda, water 6%, EtOH-solvent 1:1 (v/v), $V_e=5\text{ cm}^3$, prot.alk. 1 mg, temp.30°C



Rys. 2. Rozdział AT (1) i ATEE (2) metodą HPLC.

Fig. 2. Resolution of AT (1) and ATEE (2) by HPLC method.

Analiza produktów reakcji

Opracowana metoda analizy HPLC umożliwia w ciągu 4 minut jednoczesne oznaczenie ATEE i AT w mieszaninie reakcyjnej z pominięciem oddzielnego wydzielania produktu reakcji.

Podsumowanie

Badano syntezę estru N-Ac-L-Tyr z udziałem natywnej oraz immobilizowanej serynowej proteinazy alkalostabilnej PB92 w środowisku alkoholu etylowego o zawartości wody od 0 do 25%. Uzyskane wyniki potwierdziły duży wpływ wody na aktywność katalityczną enzymu. Wykazano, że dla natywnego enzymu, 6% wody w układzie stwarza optymalne warunki, w których reakcja przebiega z największą szybkością początkową, $2,5 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$, z wydajnością 96% (po 48 godzinach reakcji). Jednak immobilizowana proteinaza wykazywała generalnie wyższą aktywność i stabilność w porównaniu z jej natywną formą. Dlatego też preparat ten został wybrany do przyszłych badań kinetycznych w układach niektórych rozpuszczalników hydrofilowych oraz hydrofobowych. Reakcję estryfikacji N-Ac-L-Tyr katalizowaną przez natywną proteinazę przeprowadzono również w układach hydrofilowych solwentów: EtOH-acetonitryl// -aceton// -DMF. Synteza nie przebiegała w obecności acetonu oraz dime-tyloformamidu. Stwierdzono, że ich niekorzystny wpływ na katalizę reakcji może być spowodowany deformacją warstwy wody niezbędnej do stabilizowania konformacji biokatalizatora.

LITERATURA

- [1] Brink L.E.S. i in.: Biocatalysis in organic media, *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 1988, 736.
- [2] Chen L.F, Tsao G.T.: Chemical procedures for enzyme immobilization on porous cellulose beads, *Biotechn. and Bioeng.*, **19**, 1977, 1463.
- [3] Griebenow K., Klibanov A.M.: Can conformational changes be responsible for solvent and excipient effects on the catalytic behavior of subtilisin Carlsberg in organic solvents? *Biotechn. and Bioeng.*, **53**, 1997, 351.
- [4] Davis N.C., Smith E.L.: *Methods of Biochemical Analysis* (2 ed. by D. Glick) New York 1985, 215.
- [5] Halling P.J.: Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems: Predictions of effects on equilibrium position, *Biotechn. and Bioeng.*, **35**, 1990, 691.
- [6] Ingalls R.G i in.: Reversal of enzymatic hydrolysis: rate and extent of ester synthesis as catalyzed by chymotrypsin and subtilisin Carlsberg at low water concentrations. *Biotechn. and Bioeng.*, **17**, 1975, 1627.
- [7] Khmelnitsky YU.L. i in.: Engineering biocatalytic systems in organic media with low water concentration, *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 1988, 710.

- [8] Kirimura J.R i in.: The contribution of peptides and amino acids to the taste of foodstuffs, *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 1969, 689.
- [9] Kise H., Shirato H.: Enzymatic reactions in aqueous-organic media.v. Medium effect on the esterification of aromatic amino acids by α -chymotrypsin, *Enzyme Microb.Technol.*, **10**, 1988, 582.
- [10] Kise H., Hayakawa, A.: Immobilization of proteases to porous chitosan beads and their Catalysis for ester and peptide synthesis in organic solvents, *Enzyme Microb.Technol.*, **13**, 1991, 584.
- [11] Klibanov A.M.: Enzymes that work in organic solvents, *Chemtech*, 1986, 354.
- [12] Klibanov A.M.: Why are enzymes less active in organic solvents than in water?, *Tibtech*, **15**, 1997, 97.
- [13] Kłyszajko-Stefanowicz L.: *Cytobiochemia*, PWN Warszawa, 1995, 65.
- [14] Kui Xu, Griebenow K.: Correlation between catalytic activity and secondary structure of subtilisin dissolved in organic solvents, *Biotechn. and Bioeng.*, **56**, 1997, 485.
- [15] Laane C i in.: Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechn. and Bioeng.*,**30**, 1987, 81.
- [16] Lowry O.H., Rosenborough N.J., Farr A.L.: Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 1951, 265.
- [17] Lozano P., Diego T., Iborra J.L.: Effect of water-miscible aprotic solvents on kyotorphin synthesis catalyzed by immobilized α -chymotrypsin, *Biotechnology letters*,**17**, 1995, 603.
- [18] Martin J.R. i in.: The solution structure of serine protease PB92 from *B.alcalophilus* presents a rigid fold with a flexible substrate-binding site, *Structure*, **5**, 1997, 521.
- [19] Zaks A., Klibanov A.M.: The effect of water on enzyme action in organic media, **263**, 1988, 8017.

ENZYMATIC SYNTHESIS OF N-ACETYL-L-TYROSINE ETHYL ESTER IN ORGANIC MEDIA

S u m m a r y

The esterification of N-acetyl-L-tyrosine catalysed by native and immobilized on porous glass high-alkaline proteinase from *B. alcalophilus* PB92 in ethanol was studied. It was observed that native proteinase catalysed synthesis of N-Ac-L-Tyr ethyl ester (ATEE) in environment of 6% water concentration with initial rate $2.5 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol min}^{-1}$. However immobilized proteinase showed higher activity and stability comparing with her native form. Catalytic activity in cosolvent systems (water concentration 6%) : ethanol-acetone// -acetonitrile// -DMF 1:1 (v/v) was also investigated. Synthesis of ATEE in the presence of acetone and acetonitrile wasn't observed. ☒

SYLWIA BONIN, WIESŁAW WZOREK

DŁUGOTRWAŁA, CIĄGLA FERMENTACJA WINIARSKA Z DROŹDZAMI IMMOBILIZOWANYMI NA SZKLE PIANKOWYM

Streszczenie

Celem pracy było przeprowadzenie długotrwałej, ciągłej fermentacji winiarskiej z drożdżami immobilizowanymi na szkle piankowym.

Fermentację prowadzono przez okres ponad 4,5 miesiąca, w temp. 22°C. Przepływ medium przez 4 szklane kolumny wypełnione kostkami szkła piankowego wynosił 5–6 dni. Stwierdzono prawidłowy przebieg fermentacji przez okres ponad 3 miesięcy. Po tym czasie nastąpił nieznaczny spadek otrzymanego alkoholu, a w 5. miesiącu zmiany cech sensorycznych wina. W czasie fermentacji obserwowano obniżanie się liczby komórek drożdży w kolejnych kolumnach i w miarę upływu czasu pracy fermentora, a także wzrost liczby komórek nieaktywnych życiowo. Obserwacje mikroskopowe wykazały zmiany w kształcie komórek. Stwierdzono, że możliwe jest prowadzenie ciągłej fermentacji winiarskiej z drożdżami immobilizowanymi na szkle piankowym przez okres 3-4 miesięcy.

Wstęp

W ostatnich latach, w procesie ciągłej fermentacji obserwuje się wzrost zainteresowania wykorzystaniem unieruchomionych komórek drożdży [17]. Badania te prowadzone są głównie w kierunku produkcji etanolu [13]. Nieliczne prace z zakresu fermentacji winiarskiej donoszą głównie o wykorzystaniu drożdży immobilizowanych metodą pułapkowania w różnych rodzajach żeli [2, 3, 5, 8, 11]. „Kuleczki” żelu są jednak ściśliwe i wykazują tendencję do osadzania się na dnie zbiorników fermentacyjnych, co utrudnia przepływ medium. Stwarza to konieczność stosowania fermentorów z mieszaniem fluidyzacyjnym lub z zastosowaniem przegród [16]. Ponadto w kwaśnym środowisku wina, żele tracą swe właściwości mechaniczne, a przy dłuższym użyciu mogą ulec destrukcji. Niektórzy wskazują też na niekorzystny wpływ na właściwości sensoryczne otrzymanego produktu [5].

Stąd też wydaje się właściwe podjęcie prób nad ciągłą fermentacją winiarską z drożdżami unieruchomionymi na powierzchni twardego, nieściśliwego nośnika. Doświadczenia nad ciągłą fermentacją winiarską w niskiej temperaturze z drożdżami immobilizowanymi na powierzchni pumeksu (porowatego, wulkanicznego minerału zawierającego około 70% SO_2) przeprowadzili Bakoyianis i wsp. [1]. W naszym Zakładzie w badaniach nad szeryzacją win owocowych do immobilizacji komórek drożdży wykorzystano białe szkło piankowe [14, 15]. Nośnik ten zastosowano również do unieruchamiania drożdży w ciągłej fermentacji winiarskiej trwającej 33 dni [18].

Celem pracy była próba określenia wpływu długotrwałej, ciągłej fermentacji winiarskiej z drożdżami immobilizowanymi na szkłe piankowym, na cechy otrzymywanego wina.

Materiały i metody badań

Zestaw do prowadzenia ciągłej fermentacji składał się z 4 szklanych kolumn wypełnionych kostkami szkła piankowego, pompy zasilającej, zbiornika zasilającego i odbieralnika.

Nastaw winiarski przygotowywano z soku odtworzonego z koncentratu jabłkowego, przy czym zawartość cukrów ogółem wynosiła po uzupełnieniu sacharozą ok. 320 g/dm^3 . Nastaw wzbogacano w pożywkę azotową, a także sulfitowano do ilości $80 \text{ mg/dm}^3 \text{ SO}_2$ w celu przeciwdziałania rozwojowi szkodliwej mikroflory w czasie fermentacji.

Do fermentacji używano drożdże z gatunku *Saccharomyces cerevisiae*, rasy S.o./1AD, adaptowane do wysokiego stężenia cukrów i alkoholu, pochodzące z kolekcji czystych kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW. Drożdże dodawano jednorazowo przed rozpoczęciem fermentacji, a kolumny napełniano stopniowo w odstępach dwudniowych. Przerwy te umożliwiały osadzenie się drożdży na powierzchni nośnika.

Przed rozpoczęciem fermentacji przeprowadzano pasażowanie drożdży mające na celu przyzwyczajenie ich do obecności SO_2 w nastawie i do wzrastającej zawartości cukrów.

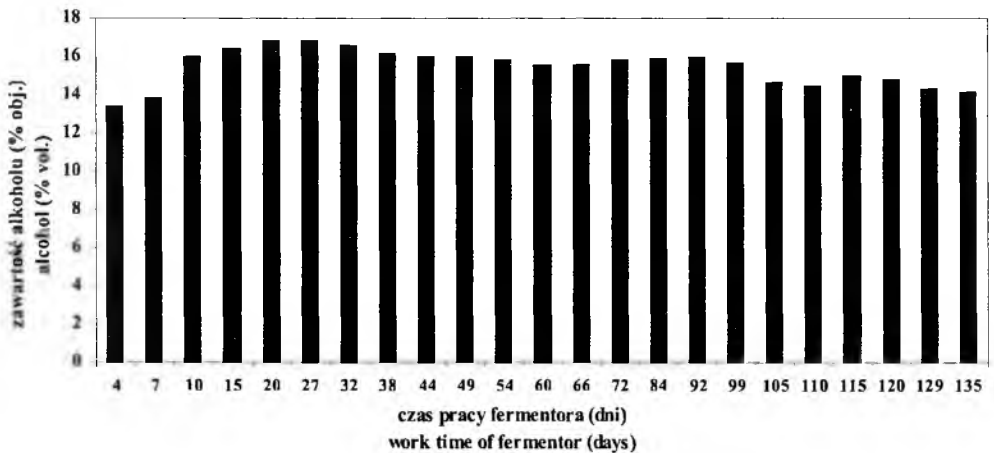
Fermentację prowadzono w temp. ok. 22°C przez okres ponad 4,5 miesiąca od momentu rozpoczęcia zasilania, przy czym przepływ przez baterię fermentorów wynosił ok. 5–6 dni.

W trakcie procesu fermentacji prowadzono analizę chemiczną zgodnie z powszechnie stosowaną metodyką. Przeprowadzano również ocenę sensoryczną wina w skali pięciopunktowej o 9 poziomach jakości wyliczając ocenę ogólną jako średnią ważoną przy współczynnikach ważkości: barwa-1, zapach-2, smak-6. Określano także liczbę komórek drożdży w medium w poszczególnych kolumnach fermentora metodą liczenia bezpośredniego w komorze Thoma oraz metodą płytkową. Po zakończeniu

procesu oznaczano w kolejnych kolumnach liczbę komórek drożdży na powierzchni nośnika z uwzględnieniem komórek nieaktywnych życiowo.

Wyniki i dyskusja

Ilość otrzymywanego alkoholu wzrastała w początkowym okresie pracy fermentorów. Najwyższą ilość alkoholu otrzymano ok. 20–30 dnia fermentacji i wynosiła ona 17,4% obj. Następnie poprzez zwiększenie przepływu starano się uzyskiwać ok. 16% alkoholu, tzn. przepływ przez kolumny wynosił wtedy ok. 5–6 dni. W 4 miesiącu fermentacji nastąpił nieznaczny spadek ilości otrzymywanego alkoholu i wynosił on ok. 15%, a w 5 miesiącu ok. 14% (rys. 1). Fermentację ciągłą należy prowadzić w ten sposób, aby w winie opuszczającym linię pozostało 2–3% nie przefermentowanych cukrów podtrzymujących aktywność życiową drożdży [19]. Stąd nie starano się zmniejszać przepływu dla pełnego odfermentowania cukrów.



Rys. 1. Wpływ czasu trwania fermentacji ciągłej na zawartość alkoholu w winie.

Fig. 1. Influence of continuous time of fermentation on alcohol content in wine.

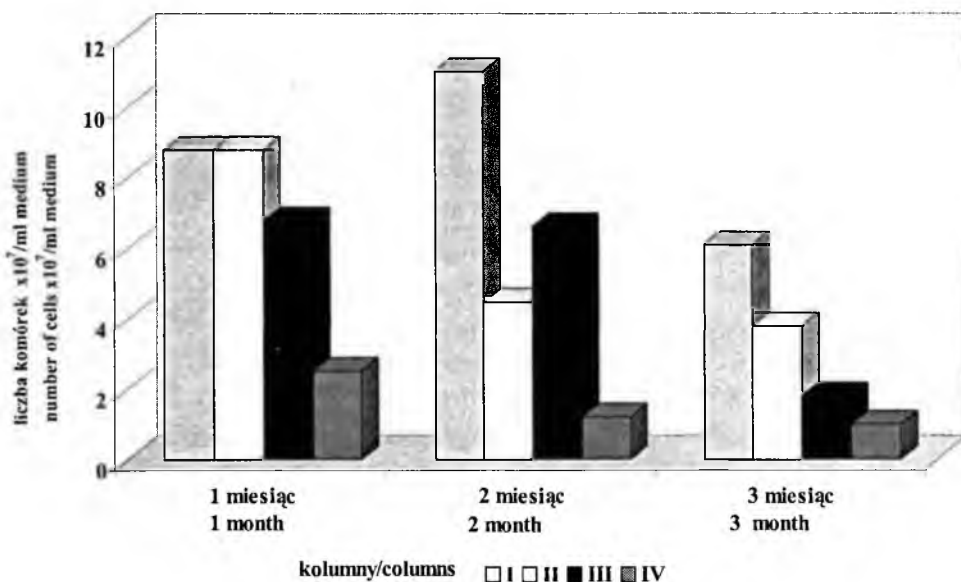
Jakość młodych win była dobra (bez dodatkowej obróbki) i na wyrównanym poziomie przez okres ponad 3 miesiący trwania fermentacji. Pod koniec 4 miesiąca nieprzerwanej fermentacji jakość win uległa niewielkiemu obniżeniu. Pojawił się specyficzny posmak i zapach, co prawdopodobnie wiązało się z procesem autolizy drożdży, a ocena ogólna uległa obniżeniu do 3,7 punktu (tab. 1). Powyższe dane wskazują na znaczną stabilność w procesie fermentacji w ciągu ponad trzech miesięcy jego trwania. Bakoyianis i wsp. [1] prowadzili ciągłą fermentację winiarską przez okres 75 dni obniżając stopniowo temperaturę z 27 do 5°C. Natomiast Ogbonna i wsp. [12] prowadzili

proces fermentacji ciągłej przez 42 dni używając drożdży immobilizowanych w postaci membrany w alginianie wapnia na szklanych biowłódkach. Dallmann i wsp. [2] przeprowadzili trwającą 15 dni ciągłą fermentację soku jabłkowego z użyciem drożdży pułapkowanych w alginianie wapnia. O trwającej 5 miesięcy fermentacji z drożdżami immobilizowanymi również w alginianie wapnia donoszą Nagashima i wsp. [10]. Jednak badania te prowadzone były w kierunku otrzymywania alkoholu z trzciny cukrowej.

Tabela 1

Wpływ czasu trwania fermentacji ciągłej na ocenę sensoryczną win (skala 5-punktowa).
Influence of continuous fermentation time on organoleptic assessment of wines (5 point score).

Wyróżnik / Quality factor	Czas pracy fermentora (dni) / Work time of fermentor (days)			
	30	50	100	135
Barwa / Colour	3,9	3,4	4,4	4,4
Zapach / Aroma	4,1	4,4	4,0	3,3
Smak / Taste	4,2	4,0	4,0	3,7
Ocena ogólna / Total assessment	4,1	4,0	4,1	3,7

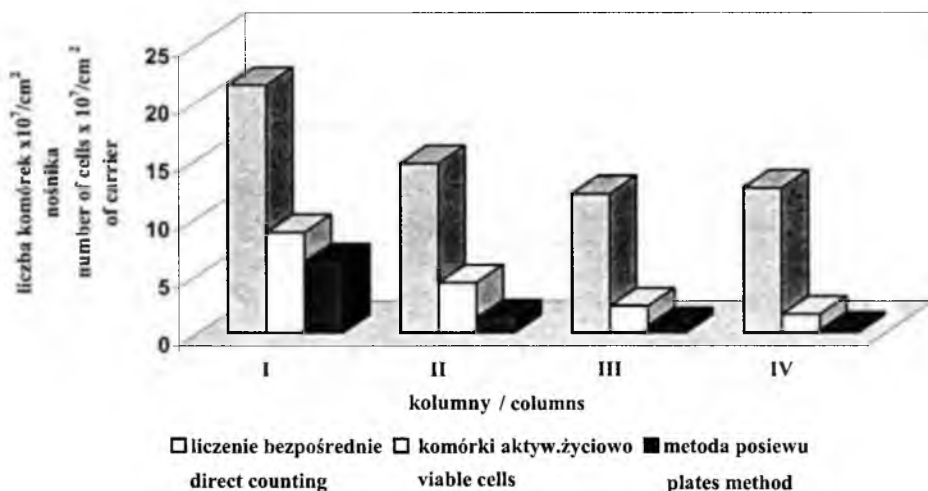


Rys. 2. Liczba komórek drożdży w kolumnach w zależności od czasu pracy fermentora.

Fig. 2. Number of yeast cells in columns depending on work time of fermentor.

W miarę upływu czasu fermentacji obserwowano obniżanie się liczby komórek drożdży w 1 ml fermentowanego medium oraz w kolejnych kolumnach. Na rys. 2. przedstawiono dane otrzymane metodą liczenia bezpośredniego. Szczególnie niewielką liczbę komórek zaobserwowano w IV kolumnie. Liczba ta wynosiła $2,5 \cdot 10^7$ komórek w pierwszym miesiącu fermentacji, a w trzecim miesiącu obniżyła się o połowę do $1,1 \cdot 10^7$, co jest spowodowane prawdopodobnie znaczną koncentracją alkoholu. Obniżanie się liczby komórek w kolejnych kadziach fermentacyjnych stwierdzili Lipiec i Krawczyk [7], prowadząc próby nad ciągłą fermentacją winiarską w skali technicznej.

Bezpośrednio po zakończeniu procesu fermentacji określano liczbę komórek drożdży na 1 cm^2 powierzchni nośnika (rys. 3). Stwierdzono spadek liczby drożdży w kolejnych kolumnach fermentora. Jednocześnie liczba komórek otrzymana metodą posiewu była niższa niż uzyskana drogą liczenia bezpośredniego, z uwzględnieniem komórek nie barwiących się błękitem metylenowym. Przyczyną może być tworzenie przez drożdże aglomeratów, łańcuszków 3–4 komórkowych. Obniżanie się liczby komórek na powierzchni nośnika jest zgodne ze stwierdzonym wcześniej spadkiem ilości drożdży w medium w kolejnych kolumnach fermentora.

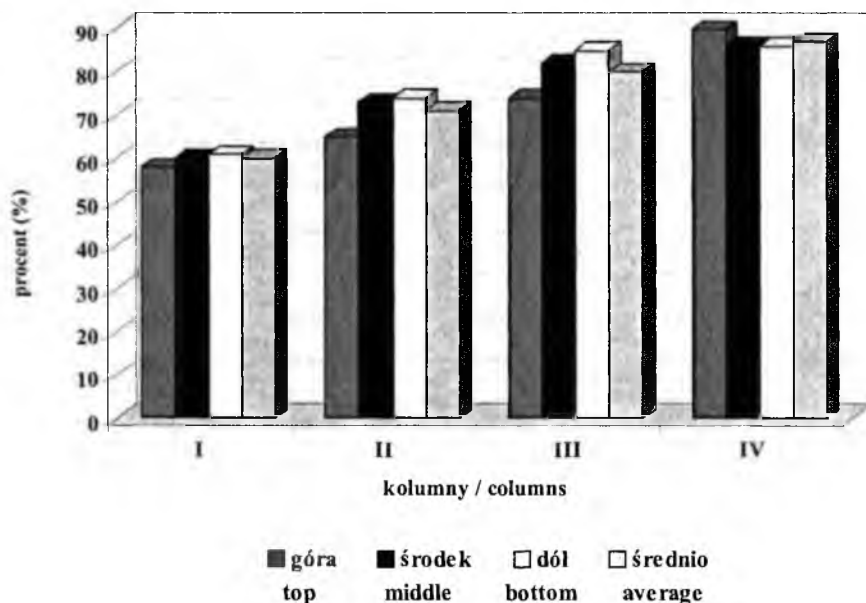


Rys. 3. Liczba komórek drożdży w kolumnach po zakończeniu fermentacji.

Fig. 3. Number of yeast cells in columns after fermentation.

Po zakończeniu fermentacji określano także procent komórek nieaktywnych życiowo na powierzchni nośnika w poszczególnych kolumnach (rys. 4). Stwierdzono wzrost liczby komórek nieaktywnych życiowo w kolejnych kolumnach. Zaobserwowano także nieznaczne zwiększenie się udziału tych komórek w dolnych partiach

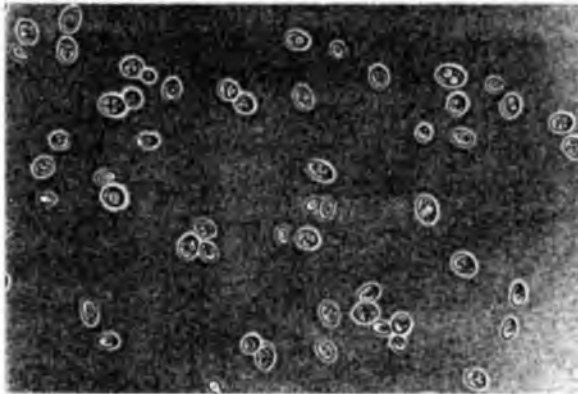
trzech kolumn, licząc od początku zestawu. Wzrost liczby komórek barwiących się błękitem metylenowym w kolejnych kadziach stwierdzili Lipiec i Krawczyk [7]. Jednak ta ciągła fermentacja trwała 92 dni i prowadzona była metodą tradycyjną.



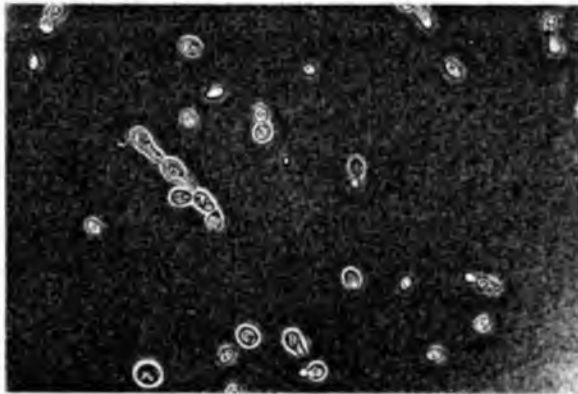
Rys. 4. Udział komórek nieaktywnych życiowo na różnych poziomach kolumn po 4,5 miesiącach pracy fermentora.

Fig. 4. Content of non-viable yeast cells on different levels of columns after 4,5 month work of fermentor.

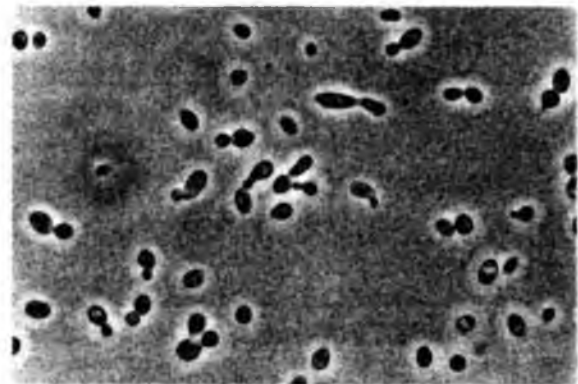
W miarę upływu czasu pracy fermentora obserwowano zmiany w kształcie komórek drożdży. Zwiększał się udział komórek wydłużonych i buławkowatych, co udokumentowano na zdjęciach z mikroskopu świetlnego (fot. 1-3). Zmiany w kształcie komórek od eliptycznych do podłużnych podczas fermentacji ciągłej zaobserwowali Hill i Robinson [4]. Stwierdzili oni, że im bardziej przepływające podłoże jest rozcieńczone, tym komórki są bardziej wydłużone. Również Lipiec [6] zaobserwowała wydłużanie się komórek drożdży w kolejnych kadziach fermentacyjnych. Stwierdzone przez nas kształty buławkowate mogą wiązać się z faktem, że przy znacznej i długotrwałej koncentracji alkoholu w środowisku może następować wyciek zawartości komórek w wyniku uszkodzenia błony komórkowej [9]. Planowane są dalsze badania w tym kierunku.



Fot. 1. Komórki „matki drożdżowej” (pow. x600).



Fot. 2. Drożdże po ponad 4,5 miesiącach fermentacji wyizolowane z nośnika (pow. x600).



Fot. 3. Komórki drożdży wyizolowane z nośnika po 4,5 miesiącach fermentacji (pow. x600).

Podsumowanie

Możliwe jest prowadzenie ciągłej fermentacji winiarskiej z drożdżami immobilizowanymi na szkłe piankowym, przez okres ok. 3–4 miesięcy, w temp. ok. 22°C, bez negatywnego wpływu na jakość otrzymywanego produktu.

Białe szkło piankowe wydaje się być odpowiednim nośnikiem drożdży w ciągłej fermentacji winiarskiej.

LITERATURA

- [1] Bakoyianis V., Kanellaki M., Kaliafas A., Koutinas A.A.: Low-temperature wine making by immobilized cells on mineral kissiris. *J. Agric. Food Chem.*, **40**, 1992, 1293.
- [2] Dallmann K., Buzas Zs., Szajani B.: Continuous fermentation of apple juice by immobilized yeast cells. *Biotech. Lett.*, **9**, 1987, 577.
- [3] Divies Ch., Cachon R., Cavin J. F., Prevost H.: Immobilized cell technology in wine production. *Critical Reviews in Biotechnology*, **14**, 1994, 135.
- [4] Hill G.A., Robinson C.W.: Morphological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* during continuous fermentation. *Biotech. Lett.*, **10**, 1988, 815.
- [5] Krasny S., Malik F., Kozankova J., Nahalka J., Minarik E.: Immobilisierte Hefen im Gärungsprozeß von Apfelmöst. *Mitt. Klosterneuburg*, **43**, 1993, 139.
- [6] Lipiec M.: Dobór ras drożdży winiarskich do fermentacji ciągłej. *Prace Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, **19**, 1969, 445.
- [7] Lipiec M., Krawczyk W.: Dobór ras drożdży winiarskich do fermentacji ciągłej. Próby techniczne. *Prace Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, **21**, 1971, 53.
- [8] Malik F., Pach L., Halama D., Bales V.: Zur Charakterisierung einiger Eigenschaften immobilisierter Weinhefen, 1. Mitteilung: Mechanische Eigenschaften immobilisierter Zellen. *Mitt. Klosterneuburg*, **40**, 1990, 205 .
- [9] Nagashima M.: Progress in ethanol production with yeasts, in: *Yest – biotechnology and biocatalysis*, New York and Basel, 57, 1990.
- [10] Nagashima M., Azuma M., Noguchi S., Inuzuka K., Samejima H.: Continuous ethanol fermentation using immobilized yeast cells. *Biotech. and Bioeng.*, **26**, 1984, 992.
- [11] Ogbonna J.C., Amano Y., Nakamura K.: Elucidation of optimum conditions for immobilization of viable cells by using calcium alginate. *J. Ferment. Bioeng.*, **67**, 1989, 92.
- [12] Ogbonna J.C., Amano Y., Nakamura K., Yokotsuka K., Shimazu Y., Watanabe M., Hara S.: A multi-stage bioreactor with replaceable bioplastes for continuous wine fermentation. *American J. Enol. Viticul.*, **40**, 1989, 292.
- [13] Olejnik A., Czaczek K.: Zastosowanie komórek immobilizowanych w przemyśle spożywczym, Cz. 1. Fermentacja etanolowa, *Przem. Spoż*, **52**, 1998, 39.
- [14] Rostkowska-Demner E.: Wpływ wybranych metod oksydacji biologicznej na skład i jakość win owocowych. Praca doktorska, SGGW, Warszawa, 1996.
- [15] Rostkowska-Demner E., Wzorek W.: Próby zastosowania szkła piankowego jako nośnika drożdży w oksydacji biologicznej win owocowych. *Żywność*, **3 (20)**, 1999, 121.
- [16] Sroka W., Rzędowski W.: Rodzaje fermentorów stosowanych w procesach fermentacji z unieruchomionymi komórkami drobnoustrojów. *Przem. Ferment. i Owoc.-Warz.*, **35**, 1991, 13.

- [17] Sroka W., Rzędowski W.: Unieruchamianie drobnoustrojów - metody, rodzaje nośników oraz ich wpływ na właściwości komórek. *Przem. Ferment. i Owoc.-Warz.*, **35**, 1991, 8.
- [18] Wzorek W., Bugajewska A., Mateusiak S., Bonin S.: Wykorzystanie drożdży immobilizowanych na szkłe piankowym w ciągłej fermentacji winiarskiej. *Żywność*, **1 (21)**, 2000, 102.
- [19] Wzorek W., Pogorzelski E.: *Technologia winiarstwa gronowego i owocowego*. SIGMA-NOT, Warszawa, 1995-1998.

LONG-LASTING, CONTINUOUS FERMENTATION BY YEAST CELLS IMMOBILIZED ON FOAM GLASS

S u m m a r y

Long-lasting, continuous wine fermentation by yeast cells immobilized on foam glass was investigated. The fermentation was carried out for more than 4,5 months at 22°C. The medium was passed through 4 glass columns with the cubes of foam glass at a rate of 5–6 days. The steady state was maintained for more than 3 months and insignificant decrease of alcohol content was observed after this period. The negative changes in the sensoric quality of wine occurred in the 5th month of investigation. The decrease in the number of yeast cells per ml of medium in the columns and at the work time of fermentor was stated. The increase in number of non-viable yeast cells in the columns was observed too. Microscopic observation shows morphological changes of yeast cells after fermentation. This research has shown that process of continuous wine fermentation with yeast immobilized on foam glass can be conducted for 3–4 months. ☒

KATARZYNA SZAMBELAN

WYKORZYSTANIE BULW TOPINAMBURU (*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.) DO PRODUKCJI ETANOLU Z UŻYCIEM DROŹDŻY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Streszczenie

Przedmiotem pracy było określenie wydajności produkcji alkoholu etylowego z bulw topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.) przy użyciu drożdży gorzelnicznych *Saccharomyces cerevisiae*: Bc16a i D2. Badania prowadzono na rozdrobnionych bulwach i na soku z bulw topinamburu dwóch genotypów: Albik i Rubik. Przed procesem fermentacji zastosowano hydrolizę kwasową i enzymatyczną inuliny i inulidów, zarówno w bulwach, jak i w soku z bulw, obu genotypów topinamburu, do cukrów prostych. Maksymalne ilości alkoholu etylowego, uzyskiwanego przy użyciu drożdży Bc16a, wynosiły:

- 1) dla rozdrobnionych bulw:
 - genotyp Albik 10,8% obj.,
 - genotyp Rubik 9,3% obj.,
- 2) dla soku z bulw:
 - genotyp: Albik 8,9% obj.,
 - genotyp Rubik 8,2% obj.

Wstęp

Topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) jest rośliną spokrewnioną ze słonecznikiem. Roślina ta posiada szeroko rozwinięty system korzeniowy wytwarzający bulwy [7, 8, 20]. Charakteryzuje się wysoką wydajnością bulw z hektara (do 34,2 t) [2, 6, 8, 13], dobrym wzrostem na ubogich i wyjałowionych glebach, odpornością na mróz i choroby oraz wysoką wydajnością węglowodanów z hektara (5-14 t) [6, 7, 8], co powoduje atrakcyjność tej rośliny i coraz większe zainteresowanie. Bulwy topinamburu mogą być wykorzystywane m.in. do produkcji fruktozy, inuliny i etanolu [1, 2, 5, 6, 9, 11, 13, 16, 17, 18, 19, 21].

Zainteresowanie bulwami topinamburu, jako surowcem do produkcji etanolu, wynika przede wszystkim ze stosunkowo wysokiej zawartości węglowodanów (11–20%), w tym inulina i inulidy stanowią 70–90% tych związków. Inulina zbudowana jest z 30 i więcej cząsteczek fruktozy (inulidy zbudowane są z mniej niż 30 cząsteczek) połączonych wiązaniami β -1,2, tworzących łańcuchy zakończone cząsteczkami glukozy [19, 21]. Konwencjonalne drożdże gorzelnicze z rodzaju *Saccharomyces cerevisiae* generalnie nie wykazują zdolności bezpośredniej fermentacji inuliny i inulidów [9]. Konieczne jest zatem odpowiednie przygotowanie podłoża, stosując procesy kwasowej lub enzymatycznej hydrolizy węglowodanów do cukrów prostych fermentujących (głównie fruktozy) [12, 15, 19, 21].

Celem pracy była ocena wydajności produkcji alkoholu etylowego z rozdrobnionych bulw i soku z bulw topinamburu (*H. tuberosus* L.) przy użyciu drożdży gorzelniczych *S. cerevisiae*: Bc16a i D2, po uprzedniej hydrolizie kwasowej i enzymatycznej węglowodanów do cukrów prostych.

Material i metody badań

Surowcem do badań były bulwy topinamburu (*Helianthus tuberosus* L.) dwóch genotypów: Albik i Rubik, otrzymane z Centrum Zasobów Genowych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie. Świeże bulwy rozdrabniano w młynku szarpakowym oraz pozyskiwano z nich sok w prasie hydraulicznej (urządzenia marki Bucher TPZ 7). Rozdrobnione bulwy i sok z bulw przechowywano do dalszych badań w stanie zamrożonym.

Materiałem stosowanym w badaniach do procesu fermentacji alkoholowej były drożdże gorzelnicze *Saccharomyces cerevisiae*: Bc16a i D2.

Procesy hydrolizy węglowodanów do cukrów prostych fermentujących prowadzono w warunkach:

- hydroliza kwasem siarkowym(VI) uzupełnianym w próbie do pH 2,0, temp. 100°C, czas 60 min,
- hydroliza enzymatyczna z użyciem preparatu enzymatycznego inwertazy „Gaminvert G”: pH 5,0, temp. 55°C, czas 60 min.

Po procesach hydrolizy pH korygowano do wartości 5,0–5,5 za pomocą 10% NaOH.

Próby w ilości 200 g miazgi lub 200 ml soku przed procesem fermentacji schładzano do temperatury nastawu (20–25°C) i zaszczepiano inokulum drożdżowym w ilości 10% (v/v). Fermentacje okresowe rozdrobnionych bulw i soku z bulw topinamburu prowadzono w temperaturze 30°C przez 72 godziny.

Zawartość cukrów redukujących (wyrażonych jako fruktoza) po wszystkich procesach obróbki, oznaczano metodą kolorymetryczną z kwasem 3,5-DNS [13].

Zawartość etanolu w płynach fermentacyjnych oznaczano po destylacji metodą areometryczną [10]. Wydajność etanolu wyrażano w procentach objętościowych.

Wyniki i dyskusja

W celu określenia wydajności produkcji alkoholu etylowego z bulw topinamburu (*H. tuberosus* L.) przeprowadzono dwie fermentacje alkoholowe: jedną z rozdrobnionych bulw, a drugą z soku z bulw; obydwie w zależności od typu hydrolizy węglowodanów – kwasowej i enzymatycznej oraz zastosowanego szczepu drożdży – Bc16a i D2 (Rys. 1–4). Rozdrobnione bulwy charakteryzowały się zawartością suchej substancji, dla genotypu: Albik 29,69% i Rubik 26,56%. Zawartość suchej substancji w soku z bulw wynosiła, w przypadku genotypu: Albik 17,33% i Rubik 15,95%.

Tabela 1

Zawartość cukrów redukujących w rozdrobnionych bulwach topinamburu po procesach hydrolizy kwasowej i enzymatycznej.

Reducing sugars content in Jerusalem artichoke tubers after acid and enzymatic hydrolysis.

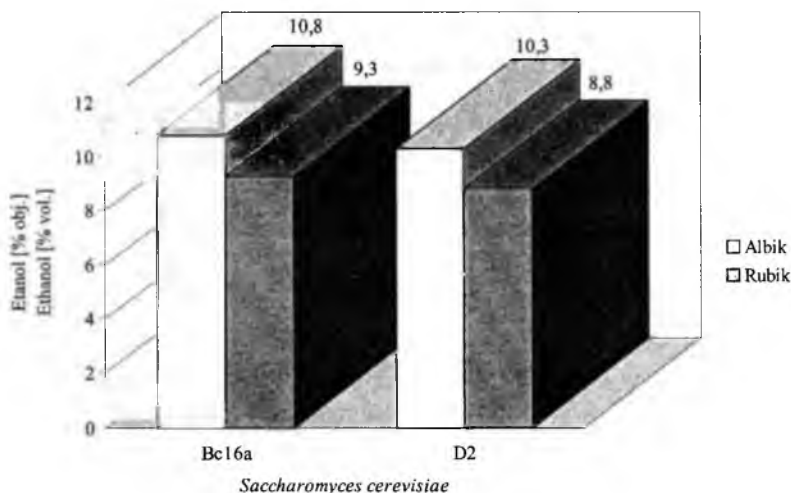
Genotyp Cultivar	Hydroliza kwasowa z użyciem H ₂ SO ₄ , 100°C, 60 minut Acid hydrolysis with H ₂ SO ₄ , 100°C, 60 minutes		Hydroliza enzymatyczna z użyciem inwertazy, 55°C, 60 minut Enzymatic hydrolysis with invertase, 55°C, 60 minutes	
	c [g/L]	c [% s.s.]	c [g/L]	c [% s.s.]
Albik	234,54	79,01	185,12	62,35
Rubik	196,93	74,15	165,11	62,16

Tabela 2

Zawartość cukrów redukujących w soku z bulw topinamburu po procesach hydrolizy kwasowej i enzymatycznej.

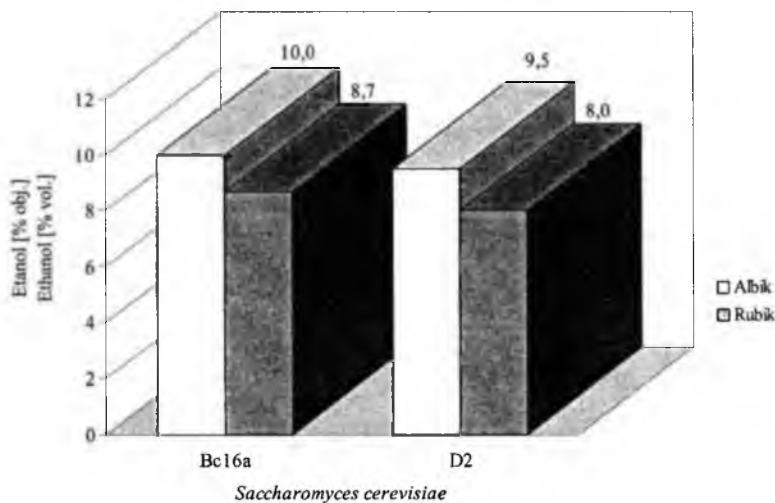
Reducing sugars content in Jerusalem artichoke juice after acid and enzymatic hydrolysis.

Genotyp Cultivar	Gęstość soku Density of the juice g/ml	Hydroliza kwasowa z użyciem H ₂ SO ₄ , 100°C, 60 minut Acid hydrolysis with H ₂ SO ₄ , 100°C, 60 minutes		Hydroliza enzymatyczna z użyciem inwertazy, 55°C, 60 minut Enzymatic hydrolysis with invertase, 55°C, 60 minutes	
		c [g/L]	c [% s.s.]	c [g/L]	c [% s.s.]
Albik	1,071	182,14	98,13	161,61	87,07
Rubik	1,067	162,41	95,43	146,26	85,94



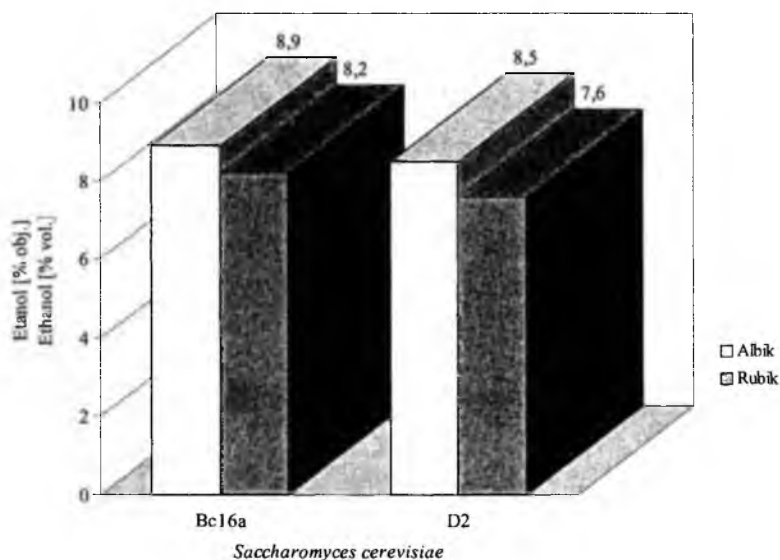
Rys. 1. Wydajność etanolu z rozdrobnionych bulw topinamburu przy użyciu drożdży *S. cerevisiae*, po hydrolizie kwasowej węglowodanów.

Fig. 1. Yield of ethanol from Jerusalem artichoke tubers using *S. cerevisiae*, after acid hydrolysis of carbohydrates.



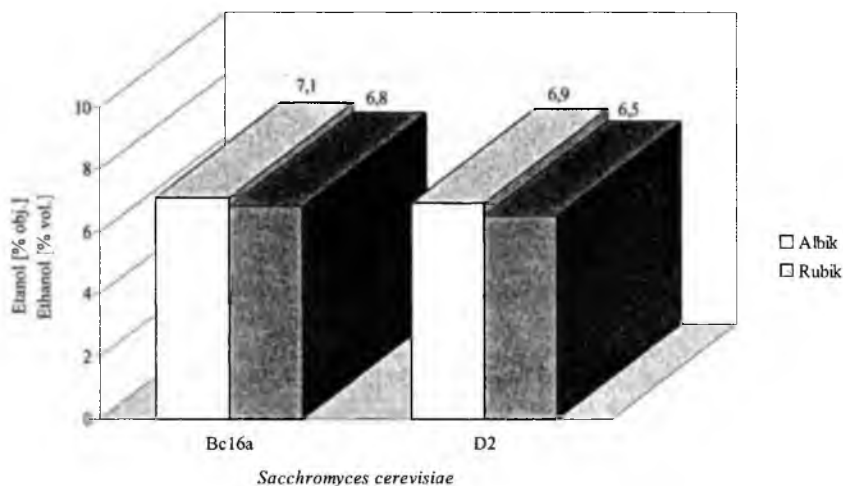
Rys. 2. Wydajność etanolu z rozdrobnionych bulw topinamburu przy użyciu drożdży *S. cerevisiae*, po hydrolizie enzymatycznej węglowodanów.

Fig. 2. Yield of ethanol from Jerusalem artichoke tubers using *S. cerevisiae*, after enzymatic hydrolysis of carbohydrates.



Rys. 3. Wydajność etanolu z soku z bulw topinamburu przy użyciu drożdży *S. cerevisiae*, po hydrolizie kwasowej węglowodanów.

Fig. 3. Yield of ethanol from Jerusalem artichoke juice using *S. cerevisiae*, after acid hydrolysis of carbohydrates.



Rys. 4. Wydajność etanolu z soku z bulw topinamburu przy użyciu drożdży *S. cerevisiae*, po hydrolizie enzymatycznej węglowodanów.

Fig. 4. Yield of ethanol from Jerusalem artichoke juice using *S. cerevisiae*, after enzymatic hydrolysis of carbohydrates.

Węglowodany zawarte w bulwach i w soku z bulw topinamburu przed procesem fermentacji poddawane były hydrolizie kwasowej i enzymatycznej w celu rozłożenia ich do cukrów prostych fermentujących (tab. 1, tab. 2). Parametry prowadzenia hydrolizy inuliny i inulidów podawane w literaturze różnią się w zależności od autorów [15, 18, 21, 22]. Najwyższe ilości cukrów fermentujących uzyskiwano w procesie hydrolizy kwasowej w rozdrobnionych bulwach topinamburu genotypu Albik: 234,54 g/L i Rubik 196,93 g/L (tab. 1). Natomiast stosując hydrolizę enzymatyczną w rozdrobnionych bulwach uzyskiwano mniejsze ilości cukrów prostych dla genotypu: Albik 185,12 g/L i Rubik 165,11 g/L (tab. 1). Tab. 2. przedstawia wpływ rodzaju hydrolizy węglowodanów na zawartość cukrów fermentujących w soku z bulw topinamburu. Hydroliza kwasowa węglowodanów w soku pozwoliła na uzyskiwanie wyższych ilości cukrów redukujących dla genotypu: Albik 182,14 g/L i Rubik 162,41 g/L, w porównaniu z hydrolizą enzymatyczną dla genotypu: Albik 161,61 g/L i Rubik 146,26 g/L (tab. 2). Zastosowanie hydrolizy kwasowej do rozkładu węglowodanów w rozdrobnionych bulwach dało lepsze efekty o około 22% w porównaniu z hydrolizą kwasową węglowodanów w soku z bulw. Natomiast hydroliza enzymatyczna węglowodanów w rozdrobnionych bulwach pozwoliła na uzyskiwanie ilości cukrów prostych wyższej o około 13% niż hydroliza enzymatyczna węglowodanów w soku z bulw topinamburu (tab. 1, tab. 2). Hydrolizę enzymatyczną prowadzono z użyciem enzymu Gaminvert G. Mimo, że enzym ten charakteryzował się głównie aktywnością inwertazy dał dobre rezultaty hydrolizy węglowodanów rozdrobnionych bulw i soku z bulw topinamburu porównywalne z danymi literaturowymi przy zastosowaniu inuliny [2]. Tak przygotowane rozdrobnione bulwy i sok z bulw topinamburu były podłożem do fermentacji alkoholowej.

Najwyższe ilości alkoholu etylowego uzyskiwano z rozdrobnionych bulw topinamburu genotypu Albik z użyciem drożdży Bc16a: 10,8% obj. etanolu, po hydrolizie kwasowej węglowodanów (rys. 1). Stosując hydrolizę enzymatyczną węglowodanów w rozdrobnionych bulwach przed procesem fermentacji uzyskiwano wydajności etanolu: dla genotypu Albik 10,0% obj. i Rubik 8,7% obj. (rys. 2).

W wyniku fermentacji alkoholowej soku z bulw topinamburu przy użyciu drożdży Bc16a, uzyskiwano następujące zawartości alkoholu etylowego: po hydrolizie kwasowej węglowodanów dla genotypu: Albik 8,9% obj. i Rubik 8,2% obj., a po hydrolizie enzymatycznej węglowodanów dla genotypu: Albik 7,1% obj. i Rubik 6,8% obj. etanolu (rys. 3, rys. 4).

Uzyskane w badaniach wydajności alkoholu etylowego z bulw topinamburu (*H. tuberosus* L.) przy użyciu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* są zbliżone lub wyższe niż podaje literatura [3, 4, 7, 18]. Większość jednak tych prac dotyczy soku z bulw topinamburu, który jest łatwiejszy w obróbce.

Przeprowadzone badania (rys. 1–4) dowodzą, że zarówno rozdrobnione bulwy, jak i sok z bulw topinamburu są dobrym surowcem do otrzymywania z nich alkoholu etylowego z użyciem drożdży gorzelnicznych *Saccharomyces cerevisiae*. Różnica między końcową zawartością etanolu uzyskanego po fermentacji rozdrobnionych bulw i soku z bulw zależała od różnicy zawartości cukrów redukujących. Wyższe stężenie cukrów redukujących w rozdrobnionych bulwach topinamburu pozwoliło na otrzymanie wyższych ilości alkoholu etylowego w porównaniu z sokiem z bulw.

Wnioski

1. Zastosowanie hydrolizy kwasem siarkowym do rozkładu inuliny i inulidów w bulwach topinamburu umożliwiło uzyskiwanie wyższych ilości cukrów prostych fermentujących w porównaniu z enzymatyczną hydrolizą za pomocą inwertazy.
2. Fermentacja rozdrobnionych bulw pozwoliła na pozyskiwanie większych ilości alkoholu etylowego niż fermentacja soku z bulw topinamburu (*H. tuberosus* L.).
3. Najlepsze efekty fermentacji obserwowano stosując genotyp Albik oraz drożdże Bc16a zarówno dla rozdrobnionych bulw, jak i dla soku z bulw topinamburu (*H. tuberosus* L.).

LITERATURA

- [1] Andrzejewski M.: Zapomniana roślina uprawna – topinambur, *Poradnik Gospodarski*, **3**, 1997, 46.
- [2] Barta J.: Jerusalem artichoke as a multipurpose raw material for food products of high fructose or inulin content, Elsevier Science Publisher B.V., 1993.
- [3] Chabbert N., Braun Ph., Guiraud J.P., Arnoux M., Galzy P.: Productivity and fermentability of Jerusalem artichoke according to harvesting date, *Biomass*, **3**, 1983, 209.
- [4] Chabbert N., Guiraud J.P., Arnoux M., Galzy P.: The advantageous use of an early Jerusalem artichoke cultivar for the production of ethanol, *Biomass*, **8**, 1985, 233.
- [5] Chrapkowska K.J., Góral S., Piasecki M.: Otrzymywanie syropów fruktozowych z bulw *Helianthus tuberosus* L. (topinambur), XXIV Sesja Naukowa KTiChŻ PAN, Wrocław 1993, 161.
- [6] Duvnjak Z., Kosaric N., Hayes R.D.: Kinetics of ethanol production from Jerusalem artichoke juice with some *Kluyveromyces* species, *Biotechnol. Letters*, **3** (10), 1981, 589.
- [7] Duvnjak Z., Kosaric N., Kliza S.: Production of alcohol from Jerusalem artichoke by yeasts, *Biotechnology and Bioengineering*, **24**, 1982, 2297.
- [8] Góral S.: Słonecznik bulwiasty – Topinambur. Uprawa i użytkowanie, Radzików 1997.
- [9] Guiraud J.P., Cailland J.M., Galzy P.: Optimization of alcohol production from Jerusalem artichokes, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **14**, 1982, 81.
- [10] Ładoński W., Gospodarek T.: Podstawowe metody analityczne produktów żywnościowych, PWN, Warszawa-Wrocław 1986.
- [11] Margaritis A., Bajpai P.: Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers (*Helianthus tuberosus*) using *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces rosei*, *Biotechnol. and Bioengineering*, **24**, 1982, 941.

- [12] Margaritis A., Bajpai P., Cannell E.: Optimization studies for the bioconversion of Jerusalem artichoke tubers to ethanol and microbial biomass, *Biotechnol. Letters*, **3** (10), 1981, 595.
- [13] Mays D.A., Buchanan W., Bradford B.N., Giordano P.M.: Fuel production potential of several agricultural crops, *Advances in new crops*, 1990, 260.
- [14] Miller G.L.: Use of dinitrosalicylate reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.*, **31**, 1959, 426.
- [15] Pekić B., Slavica B., Lepojević Ž., Petrović S.M.: Effect of pH on the acid hydrolysis of Jerusalem artichoke inulin, *Food Chemistry*, **17**, 1985, 169.
- [16] Pikulik R.: Poznajmy topinambur, *Poradnik Gospodarski*, **2**, 1994, 20.
- [17] Rosa M.F., Vieira A.M., Bartolomen M.L.: Production of high concentration of ethanol from mash, juice and pulp of Jerusalem artichoke tubers by *Kluyveromyces fragilis*, *Enzyme Microb. Technol.*, **8**, 1986, 673.
- [18] Sachs R.M., Clifford B.L., Vasavada A., Sully M.J., Williams L.A., Ziobro G.C.: Fuel alcohol from Jerusalem artichoke, *California Agriculture*, **35(9-10)**, 1981, 4.
- [19] Schorr-Galindo S., Fontana A., Guiraud J.P.: Fructose syrups and ethanol production by selective fermentation of inulin, *Current Microbiology*, **30**, 1995, 325.
- [20] Swanton C.J., Cavers P.B., Clements D.R., Moore M.J.: The biology of canadian weeds.101. *Helianthus tuberosus* L., *Can. J. Plant Sci.*, **72**, 1992, 1367.
- [21] Williams L.A., Ziobro G.: Processing and fermentation of Jerusalem artichoke for ethanol production, *Biotechnol. Letters*, 1982, 45.
- [22] Zittan L.: Enzymatic hydrolysis of inulin – an alternative way to fructose production, *Starch*, **11**, 1981, 373.

USING JERUSALEM ARTICHOKE (*HELIANTHUS TUBEROSUS* L.) TUBERS TO ETHANOL PRODUCTION BY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

S u m m a r y

The object of the studies was to investigate the yield of ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Saccharomyces cerevisiae*: Bc16a and D2. Pulp and juice of two cultivars of Jerusalem artichoke: Albik and Rubik were used in these researches. The material was used as the fermentation substrate with prior acid and enzymatic hydrolysis of the inulin and inulids in Jerusalem artichoke tubers and juice to fermentable carbohydrates. The maximum quantity of ethanol was obtained from pulp by yeast Bc16a of cultivar: Albik 10,8% vol. and Rubik 9,3% vol. and from juice of cultivar: Albik 8,9% vol. and Rubik 8,2% vol. ☒

ANNA WLAZŁY, ZDZISŁAW TARGOŃSKI

POLIFENOLOOKSYDAZA I β -GLUKOZYDAZA W WYBRANYCH OWOCACH JAGODOWYCH

Streszczenie

Oznaczano aktywność polifenolooksydazy (PPO) i β -glukozydazy w owocach takich, jak: truskawka, malina, porzeczka czerwona i porzeczka czarna. Z każdego rodzaju owocu wybrano 3 odmiany. Do oznaczenia stosowano metody spektrofotometryczne. Substratem w reakcji enzymatycznej były katechol dla PPO i p-nitrofenolo- β -D-glukozyd dla β -glukozydazy. Zbadano również wpływ pH i temperatury na aktywność tych enzymów oraz ich termiczną inaktywację.

Aktywność PPO stwierdzono jedynie w truskawkach odmiany *Senga-Sengana* i *Ducat*, a aktywność β -glukozydazy w truskawkach *Senga-Sengana*, *Ducat*, *Marmolada* i malinach *Canby*, *Beskid*, *Seedling*. Optymalne warunki dla działania PPO były następujące: pH 4,5 i temp. 45°C, a dla β -glukozydazy pH w zakresie 5,0–5,5 i temp. od 40°C do 50°C w zależności od pochodzenia enzymu.

Wstęp

Owoce i przetwory z nich otrzymywane stanowią jeden z istotnych składników diety człowieka. Z jednej strony są one źródłem składników niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmu ludzkiego, a z drugiej strony dostarczają bogactwa zapachowego i barwy żywności.

Jedną z cech żywności, którą spostrzegamy i według której oceniamy żywność od pierwszego wrażenia jest barwa. W przypadku owoców takich, jak: truskawki, maliny, porzeczki czerwone, porzeczki czarne i produktów z nich otrzymywanych barwę kształtują naturalnie występujące barwniki antocyjanowe, a także inne polifenole. Związki te podlegają jednak przemianom powodując poprzez to niekorzystne zmiany barwy. Istotny wpływ na przemiany endogennych polifenoli w szczególności w rozdrobnionych owocach i sokach ma aktywność dwóch enzymów: β -glukozydazy i polifenolooksydazy [3].

Antocyjany, występujące w formie związanej w postaci glikozydów, stanowią dominującą formę tych związków w większości owoców o barwie czerwonej [12]. β -glukozydaza powoduje odszczepienie cząsteczki cukrów z tych antocyjanów i powstanie aglikonu o mniej intensywnej barwie i mniej stabilnego, ulegającego degradacji do bezbarwnych pochodnych [3].

Polifenolooksydaza (PPO) powoduje przemianę antocyjanów występujących w formie aglikonu, jak i innych polifenoli. Katalizuje reakcje utleniania grup hydroksylowych w obecności tlenu z wytworzeniem chinonów. Powstałe chinony są wysoko reaktywne i prowadzą do reakcji polimeryzacji i kondensacji pomiędzy białkami i polifenolami oraz są zdolne do łączenia się między sobą oraz z innymi związkami, doprowadzając w ten sposób do tworzenia się wysokocząsteczkowych związków o brązowym zabarwieniu [5, 10, 11].

Związki fenolowe oddziałują korzystnie na wartość biologiczną produktów owocowych. Między innymi zapobiegają niekorzystnym zmianom naczyń krwionośnych, powodują neutralizację wolnych rodników oraz mają pewną aktywność przeciwnowotworową [7, 9]. Polifenole wykazują również aktywność przeciwutleniającą, przez co ograniczają utlenianie m.in. witaminy C i innych substancji [8].

Z żywieniowego punktu widzenia obecność PPO w owocach jest więc niekorzystna, ponieważ poprzez przemianę związków fenolowych prowadzi do utraty ich właściwości antyoksydacyjnych. Natomiast z technologicznego punktu widzenia obecność PPO z jednej strony jest niekorzystna, ponieważ powoduje niepożądane zmiany barwy produktów owocowych, a z drugiej strony ma korzystny wpływ, ponieważ powodując przemiany związków fenolowych pozbawia ich niekorzystnych właściwości, jakimi są m.in. tworzenie zmętnień i osadów w sokach, koncentratów owocowych i winach [7]. Zmętnienia te powstają w wyniku kondensacji polifenoli między sobą lub z innymi związkami.

Podatność owoców na procesy brązowienia i zmiany barwy zależy od aktywności polifenolooksydazy, ogólnej sumy zawartych polifenoli, ich budowy, od bliskości substratu dla PPO [4, 5, 7, 12], a także od aktywności β -glukozydazy.

Znajomość właściwości i aktywności polifenolooksydazy i β -glukozydazy może być pomocna przy wyborze odmian owoców i metod przetwarzania, by zagwarantować odpowiednie cechy sensoryczne produktom owocowym i stabilność ich barwy.

Celem pracy było określenie aktywności polifenolooksydazy i β -glukozydazy w owocach jagodowych oraz przeprowadzenie częściowej charakterystyki tych enzymów pochodzących z różnych odmian tego samego gatunku owoców.

Material i metody badań

Materiałem badawczym były następujące owoce:

- truskawki: *Senga-Sengana, Ducat, Marmolada*;
- maliny: *Canby, Beskid, Seedling*;
- porzeczka czerwona: *Rondom, Holenderska, Jonker*;
- porzeczka czarna: *Ojebyn, Titania, Ben Lomond*.

Owoce przechowywano w stanie zamrożenia w temperaturze -20°C .

Ekstrakcja polifenolooksydazy i β -glukozydazy

W celu przeprowadzenia ekstrakcji enzymów 20 g rozmrożonych owoców homogenizowano przez 60 sekund z 25 cm^3 buforu cytrynianowo-fosforanowego wg Mc Ilvaine'a (sporządzonego z 0,1M kwasu cytrynowego i 0,2M Na_2HPO_4) o pH 7,0 z dodatkiem Tritonu X-100 (1%) i nierozpuszczalnego poliwinylpolipirolidonu (4%) [2]. Następnie całość pozostawiono na 2 godz., w temp. 4°C , w ciemnym miejscu. Po tym czasie całość odwirowano przez 15 min, przy obr. 9000^*g , w 4°C . Do oznaczenia aktywności enzymów użyto roztworu znad osadu.

Oznaczenie aktywności polifenolooksydazy

Oznaczenia aktywności PPO dokonano w reakcji z katecholem poprzez pomiar zmiany absorbancji próby właściwej (A) i prób kontrolnych (B i C), przy długości fali 420 nm po upływie 30 min wobec wody destylowanej.

Tabela 1

Skład próby właściwej i prób kontrolnych do oznaczenia aktywności PPO.

The composition of the studied sample and the control samples in polyphenoloxidase activity assay.

Składnik Component	Próby / Samples		
	A	B	C
0,02 M katechol 0,02 M catechol	2 cm^3	2 cm^3	–
Bufor Mc Ilvaine'a Buffer Mc Ilvaine'a	1 cm^3	1 cm^3	–
Sok z owoców Fruit juice	$0,2\text{ cm}^3$	–	$0,2\text{ cm}^3$
Woda destylowana Distilled water	–	$0,2\text{ cm}^3$	3 cm^3

Oznaczenie aktywności β -glukozydazy.

Aktywność β -glukozydazy oznaczono w reakcji z p-nitrofenolo- β -D-glukozydem, poprzez pomiar absorbancji próby właściwej (A) i prób kontrolnych (B i C), przy dł. fali 420 nm po upływie 30 min i dodaniu po tym czasie 1 cm^3 1 M Na_2CO_3 do wszystkich prób.

Tabela 2

Skład próby właściwej i prób kontrolnych do oznaczania aktywności β -glukozydazy.

The composition of the studied sample and the control samples in β -glucosidase activity assay.

Składnik Component	Próby / Samples		
	A	B	C
0,9956 mM p-nitrofenolo- β -D-glukozyd 0,9956 mM p-nitrophenol- β -D-glucoside	0,75 cm ³	0,75 cm ³	–
Bufor Mc Ilvaine a Buffer Mc Ilvaine'a	0,75 cm ³	0,75 cm ³	–
Sok z owoców Fruit juice	0,2 cm ³	–	0,2 cm ³
Woda destylowana Distilled water	–	0,2 cm ³	1,5 cm ³

Absorbancję, do określenia aktywności enzymów, wyliczono według wzoru:

$$E_X = E_A - [E_B + E_C]$$

E_A – absorbancja próby A,

E_B – absorbancja próby B,

E_C – absorbancja próby C.

Za jednostkę aktywności polifenolooksydazy i β -glukozydazy przyjęto zmianę absorbancji o 0,001 wywołowaną przez 1 cm³ enzymu w ciągu 1 min w warunkach oznaczenia.

Wpływ pH na aktywność PPO i β -glukozydazy

Badając wpływ pH na aktywność enzymów dokonywano pomiaru aktywności w buforze Mc Ilvaine a o następujących wartościach pH: 3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 7,0 w temperaturze 40°C. Pozostałe warunki były takie, jak przy oznaczaniu aktywności enzymatycznych.

Wpływ temperatury na aktywność PPO i β -glukozydazy

Wpływ temperatury na aktywność w/w enzymów przeprowadzono w następujących temperaturach: 20°C, 30°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C, przy takiej wartości pH, przy której enzym wykazywał najwyższą aktywność. Pozostałe warunki były takie, jak przy oznaczaniu aktywności enzymatycznych.

Termiczna inaktywacja PPO i β -glukozydazy

W celu zbadania termicznej inaktywacji enzymów w czasie, roztwór zawierający enzym zmieszany z buforem cytrynianowo-fosforanowym wg Mc Ilvaine a (o pH przy

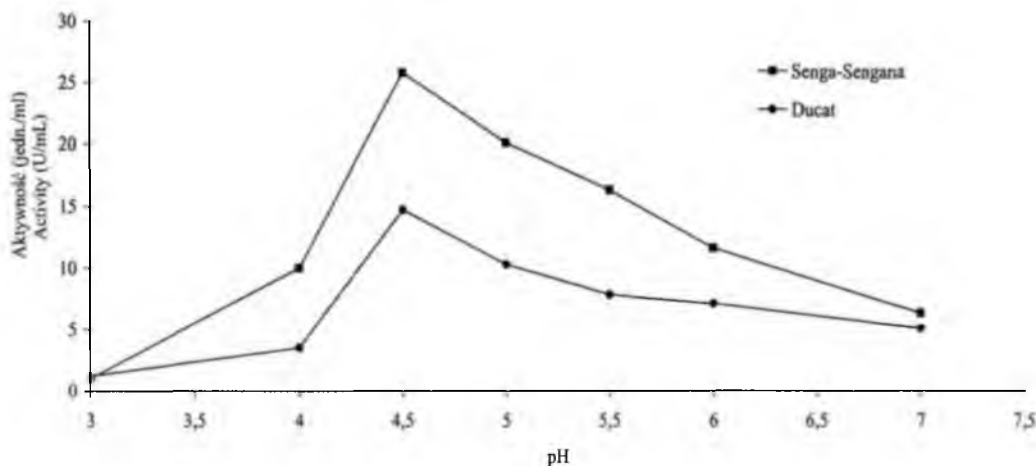
którym enzym wykazywał najwyższą aktywność) w stosunku 1:1 ogrzewano w temperaturach 45°C i 55°C i mierzono aktywność po 0,5, 1, 2, 4 godz. oraz w temperaturze 65°C mierząc aktywność po 5, 10, 15, 20, 30 minutach. Pomiaru dokonywano przy takiej wartości pH, przy której enzym wykazywał najwyższą aktywność.

Omówienie wyników

Badanie właściwości polifenolooksydazy

Aktywność polifenolooksydazy została stwierdzona jedynie w truskawkach dwóch odmian *Senga-Sengana* i *Ducat*. Pozostałe owoce nie wykazywały aktywności tego enzymu.

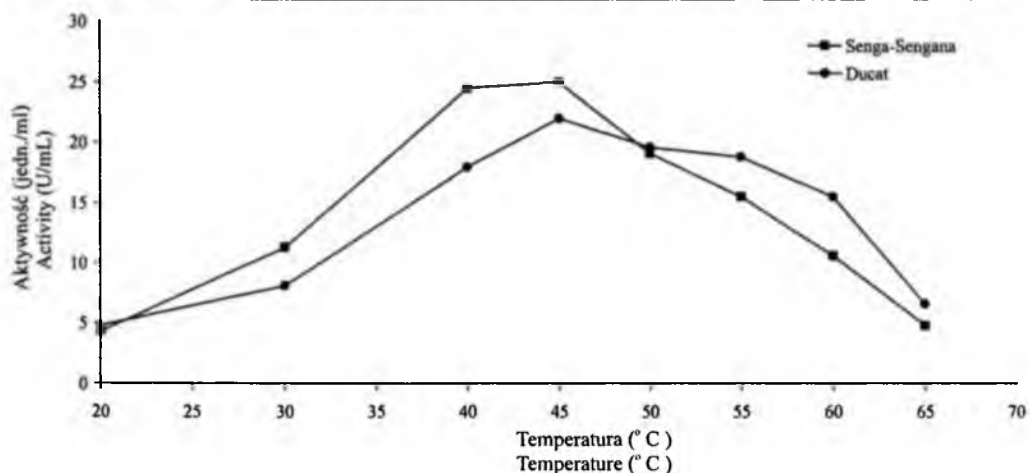
Najwyższą aktywność PPO uzyskano przy pH 4,5. Wynik ten był identyczny dla obydwu odmian truskawek: *Senga-Sengana* i *Ducat*, a aktywność wynosiła odpowiednio 25,8 i 14,7 jednostek. W zakresie pH 3,0–7,0 enzym miał najniższą aktywność przy pH 3,0. Aktywność PPO obecnej w wyciągu z truskawek odmiany *Senga-Sengana* w tym pH stanowiła jedynie 3,8% aktywności maksymalnej, a z odmiany *Ducat* 8,1% (rys. 1).



Rys. 1. Wpływ pH na aktywność polifenolooksydazy obecnej w wyciągach z truskawek.

Fig. 1. Effect of pH on the activity of strawberry polyphenoloxidase.

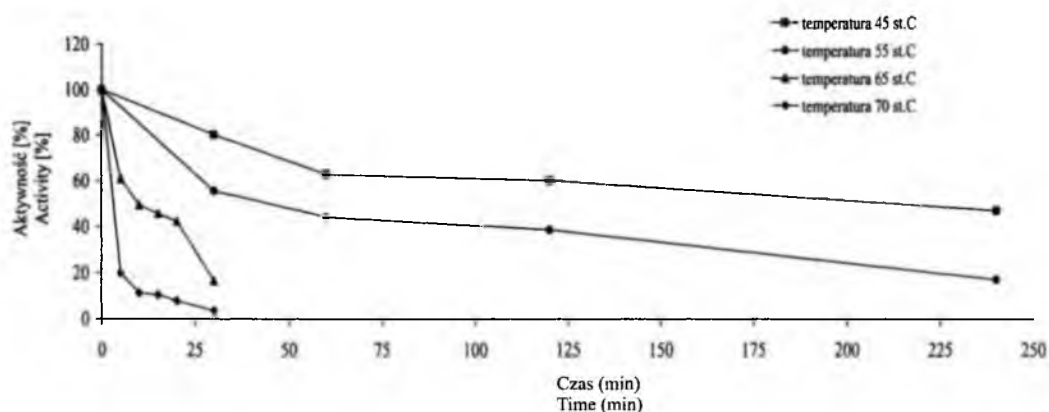
W wyniku badań aktywności PPO w różnych temperaturach, najwyższą aktywność posiadał enzym obecny w wyciągu z obydwu odmian truskawek, w temp.45°C. Poniżej i powyżej tej temperatury aktywność była niższa, lecz jeszcze w temperaturze 65°C aktywność enzymu kształtowała się na poziomie 30% aktywności maksymalnej dla odmiany *Ducat* i 19,2% dla odmiany *Senga-Sengana* (rys. 2).



Rys. 2. Wpływ temperatury na aktywność polifenolooksydazy obecnej w wyciągach z truskawek.

Fig. 2. Effect of temperature on the activity of strawberry polyphenoloxidase.

Pod wpływem ogrzewania wyciągu z owoców następował spadek aktywności PPO. Po upływie 4 godzin ogrzewania w temperaturze 45°C aktywność PPO obecnej w wyciągu z truskawek *Senga-Sengana* kształtowała się na poziomie 47% aktywności początkowej, a w temperaturze 55°C 17,2%. Całkowita inaktywacja enzymu nastąpiła w temp. 70°C po 30min ogrzewania. Natomiast w temperaturze 65°C po 30 min aktywność stanowiła 16,6% aktywności początkowej (Rys. 3).



Rys. 3. Termiczna inaktywacja polifenolooksydazy obecnej w wyciągach z truskawek *Senga-Sengana*, w różnych temperaturach.

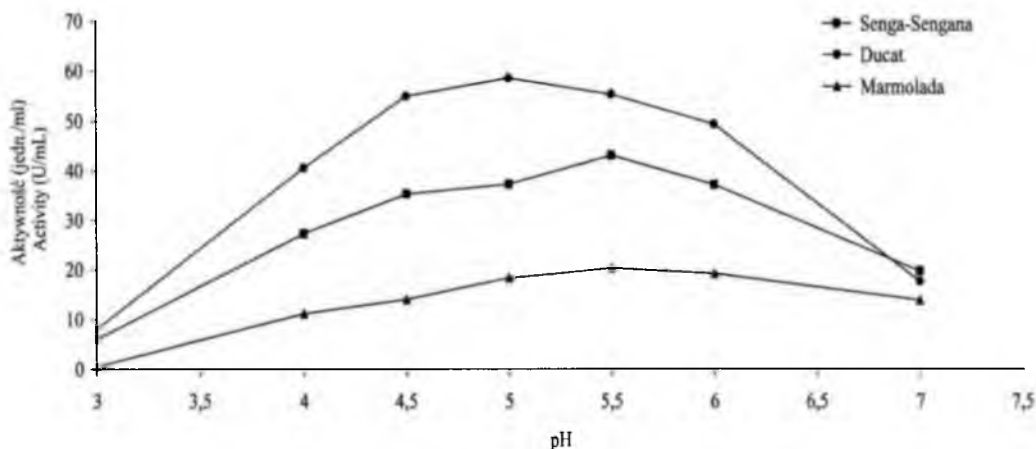
Fig. 3. Thermal inactivation of *Senga-Sengana* strawberry polyphenoloxidase at different temperature.

Badanie aktywności β -glukozydazy

Aktywność β -glukozydazy stwierdzono w truskawkach odmiany *Senga-Sengana*, *Ducat*, *Marmolada* oraz malinach odmiany *Canby*, *Beskid*, *Seedling*. Natomiast porzeczka czerwona i porzeczka czarna nie wykazywały aktywności tego enzymu.

Optymalna wartość pH dla działania β -glukozydazy wynosiła 5,0 dla enzymu obecnego w wyciągu z truskawek odmiany *Senga-Sengana*, *Ducat* i malin odmiany *Canby*, *Beskid*, *Seedling* oraz 5,5 dla enzymu obecnego w wyciągu z truskawek *Marmolada*. Najwyższą aktywność posiadał enzym obecny w wyciągu z truskawek *Ducat* i wynosiła ona 58,6 jednostki. β -glukozydaza obecna w wyciągu z malin wszystkich odmian nie posiadała aktywności w pH 3,0 i 7,0.

W przypadku β -glukozydazy obecnej w wyciągu z malin aktywność w różnych pH kształtowała się podobnie niezależnie od odmiany (rys. 5). Natomiast β -glukozydaza obecna w wyciągu z truskawek w zależności od odmiany wykazywała znaczne zróżnicowanie aktywności przy tych samych wartościach pH (rys. 4).

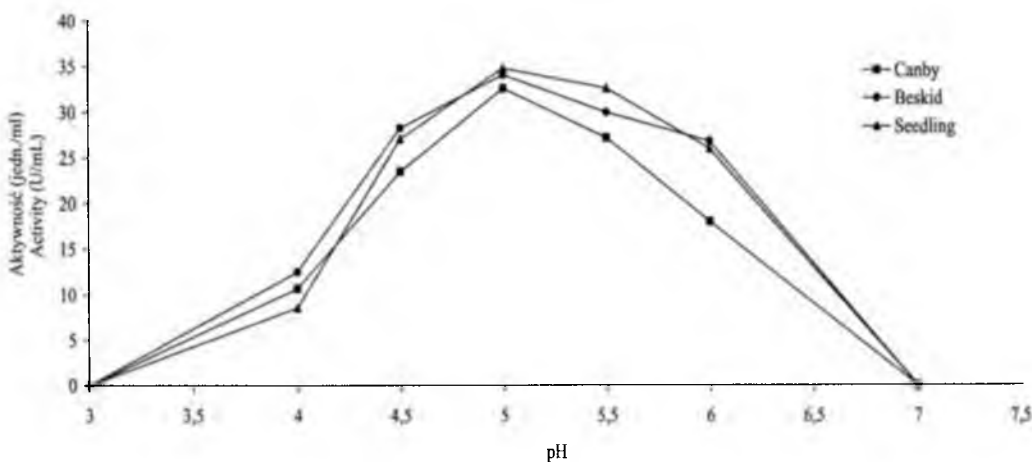


Rys. 4. Wpływ pH na aktywność β -glukozydazy obecnej w wyciągach z truskawek.

Fig. 4. Effect of pH on the activity of strawberry β -glucosidase.

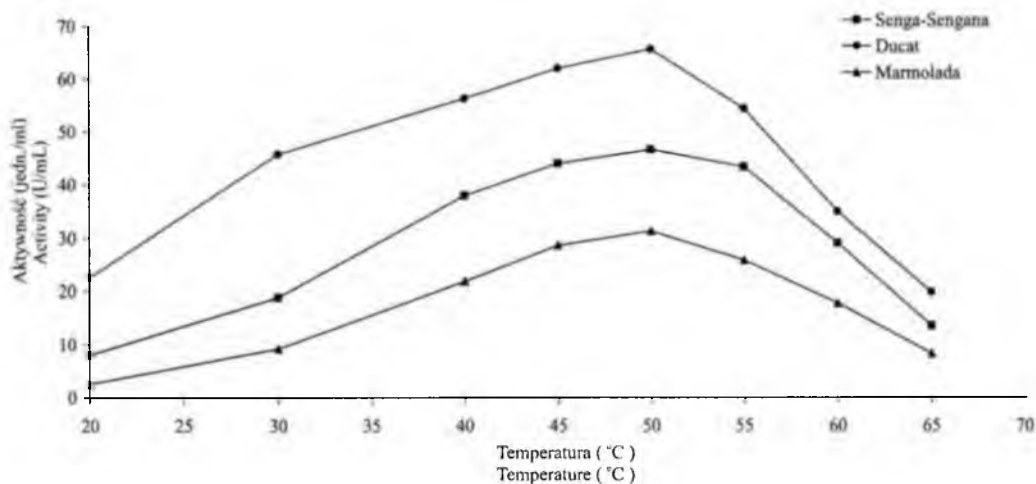
Optymalna wartość temperatury działania β -glukozydazy wynosiła 50°C w przypadku enzymu obecnego w wyciągach ze wszystkich badanych odmian truskawek, a 45°C w przypadku enzymu obecnego w wyciągu z malin *Canby* i 40°C dla enzymu obecnego w wyciągach z malin *Beskid* i *Seedling*. Najniższe aktywności uzyskano w temperaturze 65°C dla β -glukozydazy obecnej w wyciągach z truskawek *Ducat* i malin *Seedling*. Aktywność w tej temperaturze stanowiła odpowiednio 30% i 2,8%

aktywności maksymalnej. W przypadku β -glukozydazy obecnej w wyciągach z pozostałych źródeł najniższą aktywność stwierdzono w temperaturze 20°C (rys. 6 i rys. 7).



Rys. 5. Wpływ pH na aktywność β -glukozydazy obecnej w wyciągach z malin.

Fig. 5. Effect of pH on the activity of raspberry β -glucosidase.

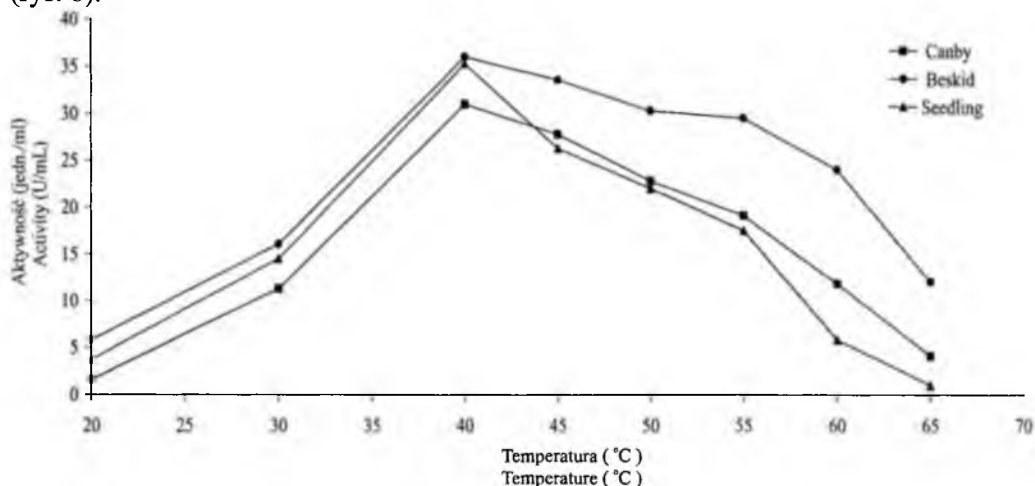


Rys. 6. Wpływ temperatury na aktywność β -glukozydazy obecnej w wyciągach z truskawek.

Fig. 6. Effect of temperature on the activity of strawberry β -glucosidase.

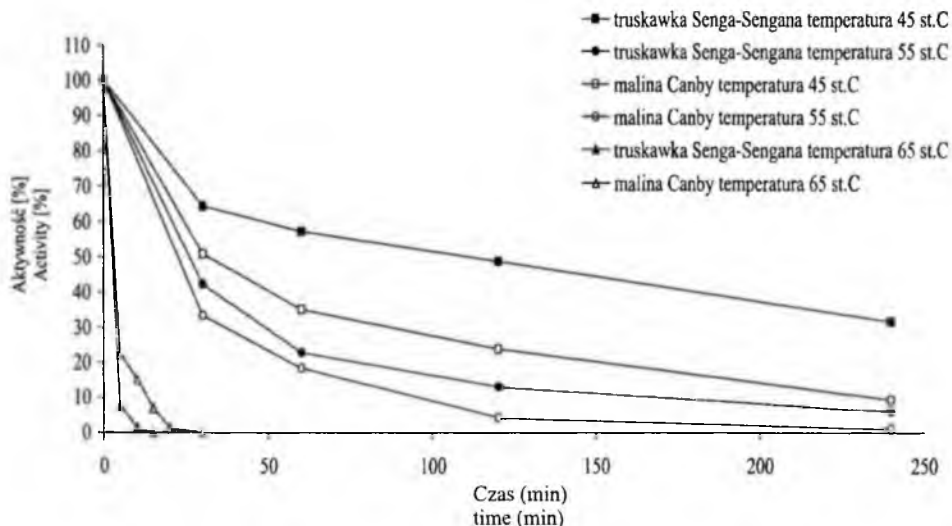
Pod wpływem ogrzewania wyciągu z truskawek *Senga-Sengana* i malin *Canby* następował spadek aktywności obecnej tam β -glukozydazy. Aktywność β -glukozydazy spadała już powyżej 40°C. Po 4 godzinach ogrzewania w temperaturze 45°C aktywność β -glukozydazy obecnej w wyciągu z truskawek kształtowała się na poziomie

31,6% aktywności początkowej, a w temperaturze 55°C na poziomie 5,8% aktywności początkowej. Natomiast aktywność β -glukozydazy obecnej w wyciągu z malin po 4 godzinach ogrzewania w temp. 45°C stanowiła 9,1% aktywności początkowej, a w temp. 55°C 1% aktywności początkowej. Całkowita inaktywacja β -glukozydazy obecnej w wyciągu z truskawek nastąpiła po 15 min ogrzewania w temp. 65°C, a β -glukozydazy obecnej w wyciągu z malin po 30 min ogrzewania w tej temperaturze (rys. 8).



Rys. 7. Wpływ temperatury na aktywność β -glukozydazy obecnej w wyciągach z malin.

Fig. 7. Effect of temperature on the activity of raspberry β -glucosidase.



Rys. 8. Termiczna inaktywacja β -glukozydazy w różnych temperaturach.

Fig. 8. Thermal inactivation of β -glucosidase at different temperature.

Wnioski

1. Owoce jagodowe, tj. truskawka, malina, porzeczka czarna, porzeczka czerwona, różnią się znacznie pod względem aktywności polifenolooksydazy i β -glukozydazy. Wpływ na poziom aktywności tych enzymów w owocach ma również odmiana.
2. Soki z porzeczki czerwonej i porzeczki czarnej nie wykazywały aktywności polifenolooksydazy i β -glukozydazy, a soki z malin i truskawek odmiany *Marmolada* wykazywały tylko aktywność β -glukozydazy.
3. Wykazane różnice w aktywności polifenolooksydazy i β -glukozydazy zależne od odmiany owocu sugerują, że aktywności tych enzymów powinny być brane pod uwagę przy opracowywaniu technologii przetwórstwa tych owoców.
4. Najwyższą aktywność wykazywała polifenolooksydaza obecna w wyciągu z truskawek odmiany *Senga-Sengana* i β -glukozydaza obecna w wyciągu z truskawek odmiany *Ducat*.
5. Optymalna wartość pH i temperatury dla działania enzymów zależały od źródła, z którego pochodziły enzymy i wynosiły dla PPO pH 4,5, temp. 45°C, a dla β -glukozydazy pH w zakresie 5,0-5,5, temp. od 40°C do 50°C w zależności od odmiany owoców.

LITERATURA

- [1] Fraignier M.P., Marques L., Fleuriet A., Macheix J.J.: Biochemical and Immunochemical Characteristics of Polyphenol Oxidase from Different Fruits of Prunus. *J. Agric. Food Chem.*, **9**, 1995, 2375.
- [2] Gonzalez E.M., De Ancos B., Pilar Cano M.: Partial Characterization of Polyphenol Oxidase Activity in Raspberry Fruits. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 1999, 4068.
- [3] Horubała A.: Zmiany barwy soków owocowych w procesach technologicznych ich otrzymywania i przechowywania. *Przem. Ferm.*, **8**, 1996, 31.
- [4] Lee C.Y., Kagan V., Jaworski A.W., Brown S.K.: Enzymatic Browning in Relation to Phenolic Compound and Polyphenoloxidase Activity Among Various Peach Cultivars. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, 99.
- [5] Łoś J., Wilska-Jeszka J., Pawlak M.: Enzymatic Oxidation of Polyphenols in Fruit Products and Model Solution. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, **1**, 1996, 83.
- [7] Oszmiański J.: Przemiany enzymatyczne związków fenolowych w układach modelowych i ekstraktach owocowych. *Zesz. Nauk. AR, Wrocław*, **74**, 1988, 7.
- [8] Oszmiański J.: Polifenole jako naturalne przeciwutleniacze w żywności. *Przem. Spoż.*, **3**, 1995, 94.
- [9] Sikorski Z.E.: Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności. WNT, Warszawa 1994.
- [10] Wesche-Ebeling P., Montgomery M.W.: Strawberry Polyphenoloxidase: Extraction and Partial Characterization. *J. Food Sci.*, **5**, 1990, 1320.
- [11] Wesche-Ebeling P., Montgomery M.W.: Strawberry Polyphenoloxidase: Purification and Characterization. *J. Food Sci.*, **5**, 1990, 1315.

- [12] Wightman J.D., Wrolstad R.E.: Anthocyanin Analysis as a Measure of Glucosidase Activity in Enzymes for Juice Processing. *J. Food Sci.*, 4, 1995, 862.

POLYPHENOLOOXIDASE AND β -GLUCOSIDASE IN SELECTED BERRY FRUITS

S u m m a r y

The activity of polyphenoloxidase (PPO) and β -glucosidase in the following fruits: strawberry, raspberry, red currant, black currant was estimated. From each kind of fruit three varieties were selected. Spectrophotometric methods were used to estimate the enzymatic activity. The substrates for the enzymatic reactions were catechol for PPO and p-nitrophenol- β -D-glucoside for β -glucosidase. The influence of pH value and temperature on the activity of the enzymes and their thermal inactivation was also investigated.

PPO activity was detected in the following varieties of strawberries: *Senga-Sengana*, *Ducat*. β -glucosidase activity in strawberries: *Senga-Sengana*, *Ducat*, *Marmolada* and in the following varieties of raspberry: *Canby*, *Beskid*, *Seedling* was studied. The optimal conditions for PPO were as follows: pH 4,5, temperature 45°C, and for β -glucosidase pH in the range of 5,0–5,5 and temperature 40°C to 50°C depending on the origin of the enzyme. ☒

EWA MAJEWSKA

SPEKTROFOTOMETRYCZNE OZNACZANIE ASPARTAMU W WYBRANYCH PRODUKTACH SPOŻYWCZYCH TYPU „LIGHT”

Streszczenie

Celem pracy było przystosowanie prostej i szybkiej metody oznaczania aspartamu, wykorzystującej spektrofotometrię VIS. Metoda polega na reakcji aspartamu z 1,4-dioxanem, dimetyloformamidem oraz p-chloranilem i pomiarze absorbancji barwnego kompleksu. Materiał do badań stanowiły koncentraty spożywcze słodzone aspartamem oraz słodzik w tabletkach. Rezultaty badań wstępnych wykazały, że zastosowana w pracy metoda pozwala na szybkie i proste oznaczanie aspartamu w wybranych produktach spożywczych.

Wstęp

Zainteresowanie zdrowym sposobem odżywiania jest zjawiskiem obserwowanym prawie na całym świecie. Mimo spożywania różnych produktów, współczesne diety coraz bardziej zaczyna łączyć konsumpcja różnorodnych produktów o obniżonej kaloryczności.

Aspartam należy do grupy nowoczesnych, intensywnych środków słodzących. W ciągu ostatnich kilku lat znalazł szerokie zastosowanie w światowej produkcji żywności dietetycznej i niskokalorycznej. Chociaż składa się on z dwóch aminokwasów, nie można go zaliczyć do naturalnych środków słodzących, gdyż otrzymywany jest metodą chemicznej syntezy. Jego kaloryczność wynosi 17 kJ/g, lecz z uwagi na wysoką siłę słodzącą (180–200 razy słodszy od sacharozy) i minimalne ilości potrzebne do uzyskania pożądanej słodczy produktów, uznawany jest za środek słodzący bezkaloryczny [3, 5]. Stabilność aspartamu jest determinowana jego strukturą chemiczną. Trwałość wiązań chemicznych obecnych w aspartamie zależy w dużym stopniu od warunków środowiska. Aspartam jest całkowicie stabilny i trwały w środowisku o wilgotności poniżej 8% [4].

Harmonizujący wpływ aspartamu na smak dosładzanych produktów sprawia, iż jest on wysoko ceniony w żywieniu. Jednakże w wysokich temperaturach i przy wysokich wartościach pH wiązania peptydowe i estrowe łatwo ulegają hydrolizie. Niewłaściwa obróbka, czy też sposób magazynowania mogą powodować wady końcowego produktu; jest to jedna z przyczyn, z powodu której zawartość aspartamu w żywności musi być regularnie sprawdzana przy opracowywaniu nowych metod obróbki, jak również przy rutynowej kontroli jakości.

Literatura podaje również, oprócz metody HPLC, spektrofotometryczne i miareczkowe metody oznaczania aspartamu [1, 6].

Celem pracy było przystosowanie metody spektrofotometrycznej VIS, wykorzystującej jako wskaźnik p-chloranil, do oznaczania aspartamu w produktach żywnościowych.

Materiał i metody badań

Materiał do badań stanowiły:

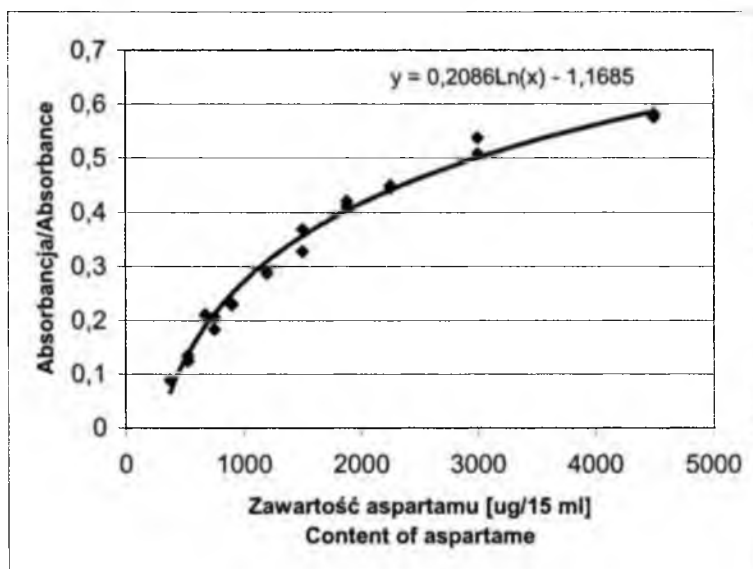
1) koncentraty spożywcze słodzone aspartamem:

- budyń śmietankowy,
- kisiel wiśniowy,
- galaretka pomarańczowa,

2) słodzik w tabletkach.

Zawartość aspartamu w badanych produktach oznaczano metodą spektrofotometryczną [6]. Z artykułów spożywczych środek słodzący ekstrahowano metanolem, w temperaturze pokojowej, przez 15 min. Próbkę po ekstrakcji sączono przez sączek fałdowany, a następnie metanol odparowywano w wyparce próżniowej. Pozostałość po odparowaniu przenoszono ilościowo, za pomocą mieszaniny chloroform:metanol (1:1), do kolb pomiarowych o poj. 50 cm³ i uzupełniano do kreski tą samą mieszaniną. Stąd do probówek kalibrowanych przenoszono po 0,675 cm³ otrzymanego roztworu i dodawano po 1,5 cm³ dimetyloformamidu i p-chloranilu. Całość uzupełniano 1,4-dioxanem do 12 cm³. Tak przygotowane roztwory inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 65°C, przez 30 min. Po ostudzeniu zawartość probówek uzupełniano do objętości 15 cm³ za pomocą 1,4-dioxanu. Absorbancję prób właściwych mierzono spektrofotometrem dwuwiązkowym (Beckman, model 24) przy długości fali $\lambda = 520$ nm wobec próby kontrolnej odczynnikowej.

Krzywą wzorcową (rys. 1) sporządzano dla każdej serii oznaczeń jako zależność absorbancji od ilości aspartamu zawartego w 15 cm³. Do obliczeń wykorzystywano równanie krzywej wzorcowej, a następnie po uwzględnieniu rozcieńczenia wyrażano w mg/100 g produktu.



Rys. 1. Krzywa wzorcowa do oznaczania zawartości aspartamu.

Fig. 1. Calibration curve for determination of aspartame.

Wyniki i dyskusja

Metodą najczęściej proponowaną do oznaczania aspartamu, zalecaną również w normach jest wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC). Jednak aparatura potrzebna do takich oznaczeń jest bardzo droga, a stosowane odczynniki muszą być najwyższej czystości. To wszystko sprawia, iż nie każde laboratorium zakładowe może sobie pozwolić na posiadanie takiego sprzętu w swym wyposażeniu. Sytuacja ta wpłynęła na podjęcie poszukiwań metod, które mogłyby służyć w rutynowej kontroli jakości. W pracy podjęto próbę wykorzystania spektrofotometrii w świetle widzialnym (VIS) do oznaczania aspartamu.

Otrzymane wyniki badań wstępnych przedstawiono w tab. 1.

Oznaczona tą metodą średnia zawartość aspartamu w budyniu śmietankowym wynosiła 369 mg/100 g produktu, co stanowiło 105% deklarowanego przez producenta dodatku substancji słodzącej (3,5 kg aspartamu na 1000 kg produktu – informacja własna). W przypadku kisielu wiśniowego obliczona średnia zawartość aspartamu stanowiła 151% deklarowanego przez producenta dodatku aspartamu (5,0 kg aspartamu na 1000 kg produktu – informacja własna) i wynosiła średnio 757 mg/100 g produktu. W galaretkę pomarańczowej oznaczona średnia zawartość aspartamu była na poziomie 1910 mg/100 g produktu. Wynik ten stanowił 112% deklarowanego przez producenta dodatku, który wynosił 1,7 kg aspartamu na 1000 kg produktu (informacja własna).

Słodzik w tabletkach wykazał średnią zawartość badanego środka słodzącego na poziomie 55,4 mg na 100 mg produktu, co również przekraczało zawartość deklarowaną przez producenta (18–20 mg aspartamu w tabletkach o masie 60–90 mg [2]).

Tabela 1

Zawartość aspartamu w badanych produktach.
Content of aspartame in investigated products.

Rodzaj produktu Product	Zawartość aspartamu / Aspartame content				Odchylenie standardowe Standard deviation
	miano	min	max	średnia	
Budyń śmietankowy	mg/100 g	346	391	369	21.7
Kisiel wiśniowy	mg/100 g	723	777	757	29.8
Galaretka pomarańczowa	mg/100 g	1903	1921	1910	9.9
Słodzik w tabletkach	mg/100 mg	54	56	55	5.4

Odchylenia standardowe dla poszczególnych produktów wahały się w granicach od 5,4 do 29,8 i stanowiły 0,5 do 9,8 % wartości średnich dla poszczególnych produktach. Choć są one dość wysokie, to na ich podstawie można stwierdzić, iż zastosowana w pracy metoda może być wykorzystywana do oznaczania aspartamu w niektórych produktach spożywczych typu koncentratów spożywczych, jak również słodzików. W celu uwiarygodnienia wykorzystywanej metody należy przeprowadzić dalsze oznaczenia aspartamu w produktach i porównać je z metodą odniesienia, jaką jest HPLC, proponowaną w literaturze z uwzględnieniem norm dla produktów słodzonych aspartamem.

Podsumowanie

Uzyskane wyniki sugerują, że do oznaczania aspartamu w niektórych produktach spożywczych może być stosowana metoda spektrofotometryczna. Ostatecznie jednak jej uznanie wymaga walidacji z wykorzystaniem metody odniesienia, jaką jest HPLC.

LITERATURA

- [1] Krutosikova A., Nher M.: Natural and syntetic sweet substances. Ellis Horwood Series in Organic Chemistry, England, 1992, 155.
- [2] Materiały reklamowe firmy Nutra Sweet.
- [3] Mączyńska D., Zdziennicka D.: Wybrane zagadnienia technologii niskokalorycznych przetworów z owoców i warzyw, *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, **12**, 1992, 25.

- [4] Modzelewska J., Mączyńska D.: Aspartam – nowy środek słodzący dopuszczony w Polsce do produkcji żywności dietetycznej, *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, **4**, 1991, 16.
- [5] Niederauer T.: Herstellung, Eigenschaften und Anwendungen von Süßungsmitteln in Lebensmitteln. *Flussiges Obst*, **65**, 1998, 131.
- [6] Prasad V.U., Divakar T.E., Sastry C.S.P.: New Methods for the Determination of Aspartame, *Food Chemistry*, **28**, 1988, 269.

SPECTROPHOTOMETRIC EVALUATION OF ASPARTAME IN SELECTED „LIGHT” FOOD PRODUCTS

S u m m a r y

The aim of this study was to adjust a simple and fast method for aspartame content determination using VIS spectrophotometry. This method is based on the reaction of aspartame with 1,4-dioxan, dimethylformamide and p-chloranil and the measurement of the colour complex absorbance. The experimental material was aspartame sweetened food concentrates and a sweetener in tablets. The results of preliminary work showed that the method used allows for fast and simple aspartame content evaluation in selected food products. ☒

MAGDALENA KOMISARUK-KASTELLI

CHARAKTERYSTYKA HISTOCHEMICZNA FORM HANDLOWYCH ZIARNIAKÓW RYŻU DOSTĘPNYCH NA POLSKIM RYNKU

Streszczenie

Celem pracy było wykazanie różnic w budowie ziarniaków oraz w podstawowym składzie chemicznym: białek i lipidów w ziarniakach ryżu dostępnych na polskim rynku. W skład ziarniaka ryżu w porównaniu z innymi zbożami wchodzi cieńsza okrywa owocowo-nasienna, a warstwa aleuronowa ziarniaka zawiera tylko 1 lub 2 poziomy komórki.

Wstęp

Kierunki wykorzystania ryżu zależą od tego, jaką część ziarna bierzemy pod uwagę. Łuski (plewy) wykorzystuje się jako absorbenty, nośniki, komponenty materiałów budowlanych, izolacje, wypełniacze, środki filtrujące, materiał do opakowań. Z otrąb, zarodków i mączki ryżowej otrzymuje się nawozy, pasze, olej ryżowy, środki farmaceutyczne, koncentrat witaminy B. Do celów spożywczych, po obłuszczeniu, uzyskuje się kaszkę oraz ryż łuszczony pozbawiony łuski plewkowej i częściowo okrywy owocowej, ryż szlifowany – pozbawiony łuski i okrywy owocowo-nasiennej lub ryż polerowany – o błyszczącej powierzchni zawierającej samo bielmo skrobiowe.

Celem pracy było wykazanie różnic w budowie ziarniaków oraz w podstawowym składzie chemicznym: białek i lipidów w ziarniakach ryżu dostępnych na polskim rynku.

Materiały i metody badań

Do badań wykorzystano ryż długoziarnisty (w woreczkach), ryż dziki i tzw. ryż naturalny.

Materiał doświadczalny przygotowano w oparciu o metodykę sporządzania skrawków mikroskopowych z ziarniaków zbóż [1]. Skrawki mikroskopowe barwiono dwiema technikami: na obecność związków białkowych – metodą Bonhaga [2] i na obecność związków lipidowych – czerwiecią oleistą O [2]. Wyniki reakcji barwnych sprawdzono przy użyciu mikroskopu świetlnego. Ilościowe oznaczenie białka wykonano metodą Kjeldahla [5], a lipidów metodą Soxhleta [5].

Wyniki i dyskusja

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zawartość białka oznaczona metodą Kjeldahla w badanych ziarniakach ryżu (tab. 1), wahała się w granicach 6,7–11,6% w suchej masie. W wyniku zastosowania barwienia na obecność i rozmieszczenie związków białkowych, zaobserwowano, że prawie dwukrotnie więcej białka zawierał ryż dziki w porównaniu z pozostałymi badanymi próbami. Najmniej białka zawierał ryż długoziarnisty (w woreczkach); jako jedyny w centralnej części ziarniaka zawierał komórki, które nie wykazywały reakcji na obecność białka. W ziarniakach ryżu najwięcej białka zawierały: warstwa aleuronowa, podaleuronowa oraz zarodek.

Tabela 1

Zawartość białka w ziarniakach ryżu.
Protein content in the rice grain.

Formy handlowe ziarniaków ryżu Rice products	Białko ogółem (% s.m.) Protein
Długoziarnisty (w woreczkach) Long grain (in bags)	6,7
Naturalny Natural	7,8
Dziki Wild	11,6

Zawartość tłuszczu określona metodą Soxhleta (tab. 2) wahała się w granicach 0,16–2,20% w suchej masie. Najwięcej tłuszczu zawierał ryż dziki, a najmniej ryż długoziarnisty (w woreczkach). W bielmie tłuszcz występował najczęściej pod postacią kuleczek. Najwięcej tłuszczu w ziarniakach ryżu znajdowało się w warstwie aleuronowej, podaleuronowej oraz w zarodku.

W tab. 3. przedstawiono różnice w budowie ziarniaków ryżu. Wśród badanych form handlowych ziarniaków ryżu tylko ryż dziki zawierał zarodek, niezłuszczoną warstwę aleuronową oraz okrywą owocowo-nasienną.

Tabela 2

Zawartość tłuszczu w ziarniakach ryżu.
Lipid content in the rice grain.

Formy handlowe ziarniaków ryżu Rice products	Tłuszcz ogółem (% w s.m.) Lipid
Długoziarnisty (w woreczkach) Long grain (in bags)	0,16
Naturalny Natural	1,70
Dziki Wild	2,20

Tabela 3

Charakterystyka anatomiczna badanych ziarniaków ryżu.
Characteristics of the tested rice grains.

Formy handlowe ziarniaków ryżu Rice products	Kształt Ziarniaka Shape	Barwa Colour	Okrywa owocowa i nasienna Hull	Warstwa Aleurono- wa Aleuronic layer	Bielmo Endosperm	Zarodek Germ
Długoziarnisty (w woreczkach) Long grain (in bags)	długie i wąskie	biała	złuszczona	złuszczona	komórki od środka bielma rozchodzą się promieniście	złuszczony
Naturalny Natural	krótkie i szerokie lub dłuższe i węższe	kremowa, zielona, biała lub jasnobrązowa	częściowo złuszczona	częściowo zachowana	komórki od środka bielma rozchodzą się promieniście lub przypominają mozaikę	może być obecny; kształtem przypomina owal lub nieforemny kwadrat
Dziki Wild	bardzo długie i wąskie	brązowa	zachowana	zachowana	komórki w bielmie przypominają mozaikę	obecny; kształt podobny do trójkąta

Podsumowanie

Porównując ryż z innymi zbożami zaobserwowano, że w warstwie podaleurono-
wej występują znaczne ilości tłuszczu, a w komórkach aleuronowych i komórkach

bielma związku białkowe znajdują się w większej ilości przy ścianach komórek, niż w ich częściach centralnych. Największe ilości białka i tłuszczu zawierał ryż dziki, co jest bardzo korzystne, z punktu widzenia wartości odżywczej. W przypadku tej formy handlowej ryżu, również upakowanie bielma jest największe, a warstwa aleuronowa jest ściśle związana z okrywą owocowo-nasienną.

LITERATURA

- [1] Bagiński S.: Technika mikroskopowa, PWN, Warszawa 1969.
- [2] Broda B.: Metody histochemii roślinnej, PZWL, Warszawa 1941.
- [3] Del Rosario, Aurora R., Briones, Vivian P., Vidal, Amanda J., Juliano B.: Composition and endosperm structure of developing and mature rice kernel, *Cereal Chem.*, **45**, 1968, 225.
- [4] Houston D.F.: Rice. Chemistry and Technology, American Association of Cereal Chemists, St. Paul 1972.
- [5] Jakubczyk T., Haber T.: Analiza zbóż i przetworów zbożowych, SGGW-AR, Warszawa 1983.
- [6] Koźmina E.P.: Ris i jego kaczestwo, Kołos, Moskwa 1976.

HISTOCHEMICAL CHARACTERISTIC OF RICE PRODUCTS AVAILABLE ON THE POLISH MARKET

S u m m a r y

The object of the study was to show the differences in the structure of the rice grain and the chemical composition of proteins and lipids in the rice grain available on the Polish market. ☒

V SESJA MŁODEJ KADRY NAUKOWEJ PTTŻ

**POSTĘP W TECHNIKACH CHROMATOGRAFICZNYCH
W ZASTOSOWANIU DO BADAŃ ŻYWNOŚCI
Rynia n. Zalewem Zegrzyńskim 29–30.05.2000 r.**

Piąta Sesja Młodej Kadry Naukowej PTTŻ zgromadziła, podobnie jak w roku ubiegłym, młodych pracowników nauki ze wszystkich krajowych ośrodków, specjalizujących się w nauce o żywności. Sesja odbyła się w dniach 29–30.05.2000 r. w Ryni, a tematem wiodącym był „Postęp w technikach chromatograficznych w zastosowaniu do badań żywności”. Pokłosiem V Sesji jest niniejsze wydanie „Żywności”.

W Ryni gościliśmy 86 uczestników, w tym 75 uczestników studiów doktoranckich i asystentów oraz opiekunów i kierowników studiów doktoranckich.

Zasadniczym celem tej Sesji, podobnie jak pozostałych, była możliwość prezentacji wyników prac Młodej Kadry. W tym roku zgodnie z tematem Sesji szczególnie nacisk położono na prezentację prac obejmujących zastosowanie metod chromatograficznych w badaniach żywności. Przedstawiono 10 referatów i 54 postery oraz 3 referaty w Sesji towarzyszącej, zatytułowanej Forum. Artykuły niniejszego tomu stanowią rozwinięcie prac prezentowanych w czasie Sesji.

Pierwsza sesja referatowa poświęcona była wybranym aspektom analizy chromatograficznej, zaprezentowano w niej 4 referaty: Krzysztof Kołodziejczyk z Politechniki Łódzkiej omówił cechy użytkowe i kryteria doboru detektorów HPLC, stosowanych do badań żywności; Agnieszka Orkusz z Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu zreferowała postęp w chromatograficznych metodach stosowanych w analizie aminokwasów, Joanna Miłala z Politechniki Łódzkiej przedstawiła zagadnienie wykrywania i oznaczanie saponin z zastosowaniem różnych technik analitycznych, a Przemysław Zduńczyk (IRZBŻ, Olsztyn) zaprezentował możliwości zastosowania elektroforezy kapilarnej w badaniach żywności. W drugiej sesji referatowej, poświęconej tematyce oznaczania polifenoli, Beata Drużyńska (SGGW, Warszawa) zreferowała wykorzystanie metody ekstrakcji do fazy stałej i wysokosprawnej chromatografii cieczowej do oznaczania polifenoli, zaś Stanisław Kalisz z Akademii Rolniczej we Wro-

clawiu przedstawił możliwości zastosowania chromatografii cieczowej HPLC z detektorem diodowym do badania polifenoli w sokach owocowych.

W sesji trzeciej Elwira Worobiej z SGGW z Warszawy przedstawiła referat nt.: „Wykorzystanie SE HPLC do badania zmian zachodzących w białkach pod wpływem rodników hydroksylowych”, Dorota Nałęcz z UWM z Olsztyna przedstawiła wyniki zastosowania wysokosprawnej chromatografii cieczowej w połączeniu ze spektroskopią w nadfiolecie do identyfikacji białek mleka, Bożena Bednarczyk z Akademii Rolniczej w Szczecinie oceniła przydatność żeli dekstranowych do oznaczania produktów hydrolizy białka w solonym śledziu bałtyckim, oraz Małgorzata Korzeniowska z Akademii Rolniczej w Wrocławiu przedstawiła zagadnienie izolowania cystatyny z białka jaja w skali małej techniki z zastosowaniem filtracji membranowej i chromatografii powinowactwa.

Szczególne zainteresowanie wzbudziły zagadnienia: detekcji polifenoli w różnych materiałach roślinnych, możliwości zastosowania HPLC w połączeniu ze spektroskopią w nadfiolecie do oznaczania białek mleka oraz możliwości izolacji cystatyny z białka jaja.

Postery prezentowano w dwóch sesjach. W pierwszej znalazły się prace o problematyce analitycznej, dotyczące m.in. oceny takich składników żywności, jak: białka, lipidy, kwasy tłuszczowe, oligosacharydy. Wyniki obejmowały zarówno analizę wybranych związków, jak i ocenę produktów procesów transformacji enzymatycznych czy modyfikacji chemicznych. Przedstawiono zastosowanie technik chromatograficznych do rozdzielania i oczyszczania produktów spożywczych, do oceny towaroznawczej i badania czystości lub zafałszowań wyrobów oraz przy analizie produktów ubocznych.

W drugiej sesji posterowej przedstawiono prace o tematyce technologicznej, prezentujące takie zagadnienia, jak modyfikacje surowców i produktów, ocena surowców, wpływ procesów technologicznych na kształtowanie produktu, kontrola mikrobiologiczna i bezpieczeństwo żywności.

Duże zainteresowanie wzbudziły postery dotyczące zastosowania enzymów w środowisku niewodnym oraz izolowania enzymów aktywnych w niskich temperaturach z psychrofilnych drożdży.

Komunikaty posterowe zostały ocenione przez komisję, w których skład wchodzili młodzi uczestnicy Sesji. Oceniający stwierdzili generalnie, że przedstawione postery prezentowały zróżnicowany poziom merytoryczny i techniczny. Komisje kierowały się przede wszystkim atrakcyjnością podjętego tematu, lecz również starannością wykonania, doborem treści, zwięzłością, układem i czytelnością pracy. Spośród prezentowanych plakatów wyróżniono 4 prace.

W ubiegłym roku, podczas IV Sesji zastanawiano się nad dalszą formą i kształtem następnych spotkań Młodej Kadry. Liczne uczestnictwo w V Sesji jest dowodem celo-

wości organizowania spotkań Młodej Kadry i akceptacji takiej ich formy. Dla Uczestników Sesji do najważniejszych atutów należą: możliwość doskonalenia prezentacji wyników, zapoznanie się z pracami kolegów z innych ośrodków, dyskusje i wymiana doświadczeń. Spotkania te stanowią również platformę nawiązywania osobistych kontaktów, ważnych w życiu zawodowym.

Nie mogąc zawieść sympatyków Sesji Młodej Kadry, Zarząd Sekcji planuje spotkanie przyszłoroczne. VI Sesja, na którą gorąco zapraszam, odbędzie się w Łodzi, w terminie 29–30 maja 2001 r. Jej tematem będzie: „Jakość i prozdrowotne cechy żywności”.

Informacji udzielają: * dr inż. Krzysztof Kołodziejczyk: kkolodz@snack.p.lodz.pl

* mgr inż. Maciej Wojtczak: wojtczak@snack.p.lodz.pl

tel/fax 042 636 74 88

Zapraszam również do odwiedzenia strony Sekcji Młodych:

<http://snack.p.lodz.pl/smpttz/>

Do zobaczenia w przyszłym roku,

Ewa Mrówka

**Adresy Zarządu Głównego, Oddziałów i Sekcji
Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności**

PREZES/ODDZIAŁ	ADRES
Prof. dr hab. Nina Baryłko-Pikielna Zarząd Główny	Polskie Towarzystwo Technologów Żywności ul. Rakowiecka 36, 02-532 WARSZAWA Tel/Fax (+22) 646 68 72
Prof. dr hab. Piotr Bykowski Oddział Gdański	ul. Kołłątaja 1 (MIR), 81-332 GDYNIA Tel.: (+58) 620 5211; Fax.: (+58) 620 28 31
Prof. dr hab. Zdzisław Targoński Oddział Lubelski	ul. Skromna 8 (AR), 20-704 LUBLIN Tel.: (+81) 52 54 770; Fax.: (+81) 533 57 33
Prof. dr hab. Jadwiga Wilska-Jeszka Oddział Łódzki	ul. Stefanowskiego 9/10 (PŁ) 90-942 ŁÓDŹ Tel.: (+42) 313 433/313 435; Fax. (+42) 313 402
Dr hab. Krzysztof Surówka Oddział Małopolski	ul. Podłużna 3 (AR), 30-239 KRAKÓW Tel. (+22) 425 28 32
Dr hab. Andrzej Kuncewicz Oddział Olsztyński	Plac Cieszyński 1 (ART.), 10-957 OLSZTYN Tel.: (+89) 523 37 03; Tel./Fax (+89) 523 35 54
Prof. dr Kazimierz Lachowicz Oddział Szczeciński	ul. Kazimierza Królewicza 3 (AR), 71-550 SZCZECIN Tel.: (+01) 423 10 61
Dr hab. Danuta Kołożyn - Krajewska Oddział Warszawski	ul. Nowoursynowska 166 (SGGW), 02-787 WARSZAWA Tel.: (+22) 843 90 41 w. 1200
Prof. dr hab. Janusz Czapski Oddział Wielkopolski	ul. Wojska Polskiego 31 (AR), 60-624 POZNAŃ Tel.: (+61) 848 72 60, Fax.: (+61) 848 71 46
Prof. dr hab. Teresa Smolińska Oddział Wrocławski	ul. Norwida 25/27 (AR), 50-375 WROCŁAW Tel.: (+71) 205 284; Fax.: (+71) 205 273
SEKCJE	
Prof. dr hab. Barbara Szteke Analizy i Oceny Żywności	ul. Rakowiecka 36 (IBiPR-S), 02-532 WARSZAWA Tel. (+22) 499 167
Dr Karol Krajewski Ekonomiczna	ul. Nowoursynowska 166 (SGGW), 02-787 WARSZAWA Tel.: (+22) 843 90 41
Prof. dr hab. Teresa Smolińska Technologii Mięsa	ul. Norwida 25/27 (AR), 50-375 WROCŁAW Tel.: (+71) 205 284; Fax.: (+71) 205 273
Prof. dr hab. Krzysztof Krygier Technologii Tłuszczów	ul. Grochowska 272 (SGGW), 03-849 WARSZAWA Tel.: (+22) 810 18 42; e-mail: tzyktznoiks@alfa.aggw.waw.pl
Prof. dr hab. Waław Leszczyński Technologii Węglowodanów	ul. Norwida 25, 50-375 WROCŁAW (Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa) Tel.: (+71) 320 5221
Mgr Ewa Mrówka Młodej Kadry	ul. Rakowiecka 36 (Instytut Biotechnologii Przem. Rolnego i Spoż.), 02-532 WARSZAWA Tel.: (+22) 606 38 18

Informacja dla Autorów

Pragniemy przekazać Państwu podstawowe informacje, które powinny ułatwić pracę redakcji i ujednolicić wymagania wobec nadsyłanych materiałów.

1. Będziemy na naszych łamach zamieszczać zarówno oryginalne prace naukowe, jak i artykuły przeglądowe, które będą miały ścisły związek z problematyką żywności.
2. Planujemy również zamieszczać recenzje podręczników i monografii naukowych, omówienia z naukowych czasopism zagranicznych, sprawozdania z konferencji naukowych itp.
3. Prace prosimy nadsyłać na dyskietce wraz z wydrukowanymi 2 egzemplarzami (format A4, maksymalnie 30 wierszy na stronie, 60 znaków w wierszu).
4. Objętość prac oryginalnych, łącznie z tabelami, rysunkami i wykazem piśmiennictwa nie powinna przekraczać 12 stron.
5. Na pierwszej stronie nadesłanej pracy (1/3 od góry pierwszej strony należy zostawić wolną, co jest potrzebne na uwagi wydawniczo-techniczne) należy podać: pełne imię i nazwisko Autora(ów), tytuł pracy, nazwę i adres instytucji zatrudniającej Autora(ów), tytuł naukowy.
6. Publikacja winna stanowić zwięzłą, dobrze zdefiniowaną pracę badawczą, a wyniki należy przedstawić w sposób możliwie syntetyczny (dotyczy oryginalnych prac naukowych).
7. Do pracy należy dołączyć streszczenia w języku polskim i w języku angielskim. Streszczenia powinny zawierać: imię i nazwisko Autora(ów), tytuł pracy i treść – maksymalnie 10 wierszy.
8. Nadsyłane oryginalne prace naukowe powinny zawierać następujące rozdziały: Wstęp, Materiał i metody, Wyniki i dyskusja, Wnioski (Podsumowanie), Literatura.
9. Literatura powinna być cytowana ze źródeł oryginalnych. Spis literatury winien być ułożony w porządku alfabetycznym nazwisk autorów. Każda pozycja powinna zawierać kolejno: liczbę porządkową, nazwisko i pierwszą literę imienia autora(ów), tytuł pracy, tytuł czasopisma, tom, rok, strona początkowa. Pozycje książkowe powinny zawierać: nazwisko i pierwszą literę imienia autora(ów), tytuł, nazwę wydawnictwa, miejsce i rok wydania, tom. Informacje zamieszczone w alfabecie niełacińskim należy podawać w transliteracji polskiej. Spis literatury nie powinien zawierać więcej niż 30 najważniejszych pozycji.
10. Tabele i rysunki winny być umieszczone na oddzielnych stronach. Rysunki powinny być wykonane na kalce tuszem lub wydrukowane na drukarce laserowej. Każdy rysunek powinien być numerowany kolejno na odwrocie ołówkiem, należy również podawać nazwisko Autora i tytuł pracy, w celu łatwiejszej identyfikacji. **Podpisy rysunków i tytuły tabel oraz objaśnienia w tabelach i rysunkach należy podać w językach polskim i angielskim.** Rysunki wykonane za pomocą komputera prosimy dołączyć na dyskietce w formacie TIF lub WMF.
11. Materiałem ilustracyjnym mogą być również fotografie, wyłącznie czarno-białe.
12. Korektę prac wykonuje na ogół redakcja na podstawie maszynopisu pracy zakwalifikowanej do druku, uwzględniając uwagi recenzenta i wymagania redakcji. W przypadku daleko idących zmian, prace będą przesyłane Autorom.
13. Za prace ogłoszone w naszym kwartalniku Autorzy nie otrzymują honorarium, natomiast otrzymują egzemplarz autorski.
14. Materiały przesłane do redakcji nie będą zwracane Autorom.

NOTATKI

FOOD

The Scientific Organ of Polish Food Technologists' Society (PTTŻ) – quarterly

No 3(24) Suppl.

Kraków 2000

Vol. 7

CONTENTS

From the Editor.....	3
KRZYSZTOF KOŁODZIEJCZYK: Functional Features and Choice Criteria of HPLC Detectors Used in Food Components Analysis.....	5
AGNIESZKA ORKUSZ : Review of Chromatographic Methods Used for Analysis of Amino Acids.....	14
JOANNA SOBOLEWSKA, JACEK ROŻNOWSKI, TERESA FORTUNA: Determination of Vitamins A and E in Some Food Products by High-PERFORMANCE Liquid Chromatography (HPLC)	22
ELIZA GRUCZYŃSKA, KATARZYNA MACIASZEK: Interesterification as a Method of Modification of Properties of Lipid.....	31
JOANNA MILALA, BOGUSŁAW KRÓL: Detection and Determination of Saponins with Application of Different Chromatographic Techniques.....	39
MAŁGORZATA PIECYK: Fractionation by Gel Filtration HPLC of Crystalline and Amorphous Proteins from <i>Phaseolus</i> Beans	48
ELWIRA WOROBIJ: Changes in Molecular Mass of Legume Protein Preparations Caused by Hydroxyl Radicals.....	55
RAFAŁ WOŁOSIAK: Changes of Pea and Bean Albumins Antioxidant Activity Induced by Ascorbic Acid Addition.....	62
DOROTA SOSNOWSKA: Changes of (+)Catechin Antioxidant Activity during Enzymatic Oxidation	69
URSZULA MICHALSKA, HENRYK JELEŃ, ERWIN WAŚOWICZ: The Characteristics of Volatile Compounds Isolated from Rye Flour Leaven.....	77
MAŁGORZATA KORZENIOWSKA, WIESŁAW KOPEĆ: Cystatin Isolation from Egg White Using Membrane Filtration and Affinity Chromatography.....	88
AGNIESZKA GŁOWACKA, TADEUSZ ANTCZAK, KATARZYNA KOŁUCKA, TADEUSZ TRZMIEL: Enzymatic Synthesis of N-Acetyl-L-Tyrosine Ethyl Ester in Organic Media.....	96
SYLWIA BONIN, WIESŁAW WZOREK: Long-Lasting, Continuous Fermentation by Yest Cells Immobilized on Foam Glass.....	105
KATARZYNA SZAMBELAN: Using Jerusalem Artichoke (<i>Helianthus Tuberosus</i> L.) Tubers to Ethanol Production by <i>Saccharomyces Cerevisiae</i>	114
ANNA WLAZŁY, ZDZISŁAW TARGOŃSKI: Polyphenoloxidase and β -Glucosidase in Selected Berry Fruits.....	122
EWA MAJEWSKA: Spectrophotometric Evaluation of Aspartame In Selected „Light” Food Products	133
MAGDALENA KOMISARUK-KASTELLI: Histochemical Characteristic of Rice Products Available on the Polish Market.....	138
EWA MRÓWKA: The 5th Symposium of Young Scientific Workers, Members of PTTŻ: Advances in Chromatographic Techniques Applied to Food Analysis.....	142
Addresses of Main Board, brands and sections of PTTŻ.....	145
Instruction to authors.....	146

Only reviewed papers are published

Covered by: AGRO-LIBREX and Chemical Abstracts Service and IFIS

Wydanie czasopisma dofinansowane jest ze składek członków wspierających Polskiego Towarzystwa Technologów Żywności: **Agros Holding SA** Warszawa; **Akwawit** Leszno; **Alima-Gerber SA** Rzeszów; **Animex SA** Warszawa; **Bielmar** Bielsko-Biała, **Biolacta Texel-Rhodia** Olsztyn, **Celiko SA** Poznań; **Chio Lilly Snak Foods Sp. z o.o.**; **Coca-Cola Poland Services Ltd** Warszawa; **Hortimex Sp. z o.o.** Konin; **Kaliskie Zakłady Koncentratów Spożywczych WINIARY SA**; **Krajowe Stowarzyszenie Mleczarzy** Warszawa, **Nadodrzańskie Zakłady Przemysłu Tłuszczowego** Brzeg; **Ovita Nutricia Sp. z o.o.** Opole; **Piast Browary** Wrocław; **Pozmeat SA** Poznań; **Regis Sp. z o.o.** Wieliczka; **Rolimpex SA** Warszawa; **PHU SIC** Gościnnó, **Sławski Zakład Przetwórstwa Mięsa i Drobiu s.c. „BALCERZAK I SPÓŁKA”**; **Spółdzielnia Produkcji Piekarskiej i Ciastkarskiej** Kraków; **Tchibo** Warszawa; **Technex GmbH** Szczecin; **Van den Bergh-Foods Polska SA** Szopienice; **Zakłady Przemysłu Tłuszczowego** Warszawa; **Zakłady Tłuszczowe „KRUSZWICA” SA**.

Warunki prenumeraty

Szanowni Państwo,

uprzejmie informujemy, że przyjmujemy zamówienia na prenumeratę naszego kwartalnika, zarówno Czytelników indywidualnych, jak i od instytucji, co powinno Państwu zapewnić bieżące otrzymywanie kolejnych wydawanych przez nas numerów.

Cena jednego egzemplarza wynosi 20 zł.

Zamówienia na prenumeratę, jak i na poszczególne numery prosimy kierować na adres:

Wydawnictwo Naukowe PTTŻ

31-425 Kraków, Al. 29 Listopada 46

Nr konta: BWR I Oddz. w Krakowie

19101048-91444-27016-1101